

Identifizierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors TRPS1

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Frank Kaiser

aus Wuppertal

Juli 2003

Die der Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. Tarik Möröy

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2003

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Frank J. Kaiser, Kamiab Tavassoli, Gert-Jan Van Den Bermd, Glenn T.G. Chang, Bernhard Horsthemke, Tarik Möröy, and Hermann-Josef Lüdecke (2003) Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor suppresses the transcriptional repression activity of TRPS1.
Human Molecular Genetics, **12**, 1349-1358.
- Frank J. Kaiser, Tarik Möröy, Glenn T.G. Chang, Bernhard Horsthemke and Hermann-Josef Lüdecke. The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor.
Journal of Biological Chemistry, **278**, 38780-38785.
- Frank J. Kaiser, Paola Brega, Michael Raff, Peter Byers, Sabina Liechti-Gallati, Teresa Taylor Kay, Salomé de Almeida, Bernhard Horsthemke and Hermann-Josef Lüdecke. Novel missense mutations in the TRPS1 transcription factor define the nuclear localization signal
European Journal of Human Genetics, im Druck

für Anna Lena
und Janette

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Regulation der Transkription bei Eukaryoten	1
1.1.1 Transkriptionsaktivatoren	2
1.1.2 Transkriptionsrepressoren	3
1.2 <i>TRPS1</i> kodiert für einen Transkriptionsfaktor	4
1.3 Die Trichorhinophalangealen Syndrome (Typ I, Typ II und Typ III)	6
1.4 Zielsetzung der Arbeit/Aufgabenstellung	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Chemikalien, Enzyme, Lösungen	9
2.2 Häufig verwendete Lösungen	9
2.3 Verwendete Größenstandards	10
2.4 Plasmide	10
2.5 Oligonukleotide	11
2.6 Arbeiten mit DNA	11
2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	11
2.6.2 <i>In vitro</i> Synthese von spezifischen Mutationen	12
2.6.3 Restriktionsendonukleaseverdau	13
2.6.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	13
2.6.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restruktionsansätzen	13
2.6.4.2 Gelextraktion nach QIAquick	13
2.6.5 Ligation	14
2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese	14
2.6.7 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präp)	14
2.6.8 Präparative Plasmid-Isolierung	15
2.6.9 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung	15
2.6.10 Sequenzierung von DNA	15
2.7 Bakterien	16
2.7.1 Bakterienstämme	16
2.7.2 Bakterienmedien	16
2.7.3 Herstellung kompetenter Bakterien	17
2.7.4 Transformation kompetenter Bakterien	17
2.8 Hefen	18
2.8.1 Hefestamm	18
2.8.2 Hefemedien	18
2.8.3 Transfektion von Hefezellen	19
2.8.4 Gewinnung von Hefeextrakten	19
2.8.5 DNA-Präparation aus Hefe	20
2.8.6 β -Galaktosidase Hefe- <i>in vivo</i> -Assay	20

2.9 Zellkultur	22
2.9.1 Zelllinien	22
2.9.2 Zellkulturmedien	22
2.9.3 Kultivierung von Zellen	23
2.9.4 Passagieren von Zellen	23
2.9.5 Transiente Transfektion von Zellen	23
2.9.5.1 Calcium-Phosphat	23
2.9.5.2 Elektroporation	24
2.9.5.3 Transfektion mittels FuGENE	24
2.9.6 Luciferase-Reporter Assay	25
2.9.7 Immunfluoreszenz	26
2.10 Proteine	27
2.10.1 Gesamtproteinextrakt aus Zellen	27
2.10.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung	27
2.10.3 <i>In vitro</i> Synthese von Proteinen	28
2.10.4 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	28
2.10.5 Co-Immunpräzipitation von Proteinen	29
2.10.6 Synthese rekombinanter Proteine in Bakterien	30
2.10.7 Co-Präzipitation von Proteinen <i>in vitro</i>	31
2.10.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.10.9 Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot)	32
3. Ergebnisse	34
3.1 Analysen der vorhergesagten Kernlokalisierungssequenzen im TRPS1 Protein	34
3.2 Identifizierung potentieller Trps1-Bindeproteine	37
3.2.1 Das <i>lexA</i> Hefe Zwei-Hybrid System	37
3.2.2 Verifizierung der Hefe Zwei-Hybrid Daten durch ein induzierbares Hefe <i>in vivo</i> System	40
3.2.1.1. Analysen zur Bildung von TRPS1 Homodimeren	44
3.2.3 <i>in vitro</i> Analysen der Trps1 Interaktionen	44
3.3 Analyse der TRPS1 Protein-Protein Interaktionen in Säugerzellen	46
3.3.1 Die Interaktion von TRPS1 und LC8a	46
3.3.1.1 Expression und Co-Immunopräzipitierung	46
3.3.1.2 Intrazelluläre Verteilung von TRPS1 und LC8a	48
3.3.1.3 LC8a reduziert die Bindung von TRPS1 an die GATA-Konsensus-Sequenz	52
3.3.1.4 Die reprimierende Funktion von TRPS1 wird durch die Interaktion mit LC8a reduziert	53

3.3.2 Die Interaktion von TRPS1 und RNF4	54
3.3.2.1 Expression und Co-Immunopräzipitierung von TRPS1 und RNF4	54
3.3.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung von TRPS1 und RNF4	57
3.3.2.3 RNF4 reduziert die Bildung von TRPS1-DNA Komplexen	59
3.3.2.4 RNF4 inhibiert die reprimierende Funktion von TRPS1 in der GATA-regulierten Transkription	60
3.3.3 Die Interaktion von TRPS1 und TOPORS	61
3.3.3.1 Expression und Co-Immunopräzipitierung von TRPS1 und TOPORS	61
3.3.3.2 Intrazelluläre Lokalisation von TRPS1-Flag und GFP-TOPORS in transfizierten Zellen	63
3.3.3.2.1 Untersuchung der intrazellulären Verteilung des endogenen PML und TRPS1 Proteins in nativen humanen Fibroblasten	65
3.3.3.3 TOPORS hat keinen signifikanten Einfluss auf die durch TRPS1 vermittelte Repression	66
3.4 Wird TRPS1 durch TOPORS SUMOyliert?	68
3.4.1 Potentielle SUMOylierungsstellen innerhalb des TRPS1 Proteins	68
3.4.2 Western-Blot Analyse des TRPS1 Proteins zur Identifizierung einer möglichen SUMOylierung	70
4. Diskussion	72
4.1 TRPS1 besitzt ein funktionelles Kernlokalisierungssignal	72
4.2 Identifizierung von Interaktionspartnern des TRPS1 Proteins	74
4.2.1 Das N-terminale Trps1 Fragment F4 interagiert mit Pcbp1	74
4.2.2 Für das C-terminale Trps1 Fragment F5 konnten sechs Bindeproteine identifiziert werden	75
4.2.2.1 Punc, Arkadia und A1up interagieren mit der IKAROS-ähnlichen Region von Trps1	75
4.2.3 Die TRPS1-LC8a Interaktion	76
4.2.4 Die Interaktion von TRPS1 und RNF4	81
4.2.5 Die Interaktion von TRPS1 und TOPORS	84
4.3 Die Interaktionspartner des TRPS1 Transkriptionsfaktors	89
5. Zusammenfassung	91
6. Literaturverzeichnis	92
7. Anhang	102

Abkürzungen & Einheiten**Abkürzungen**

aa	engl.: <i>amino acid</i> ; Aminosäure
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserum-Albumin
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA (Kopie-DNA)
CLSM	confokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CMV	Cytomegalievirus
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na ₂ -Salz
EMSA	engl.: <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5phenylphenatridiumbromid)
FBS	fötales Kälberserum (engl.: FCS, <i>Fetal-Calf-Serum</i>)
GFP	engl.: green-fluorescent protein ; grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase Gen
LB-Medium	Luria Broth Base-Medium
Lsg.	Lösung
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
mRNA	engl.: <i>messenger-RNA</i> ; Boten-RNA
NaOH	Natronlauge
NLS	engl. <i>nuclear localization signal</i> ; Kernlokalisierungssequenz
NPC	engl. <i>nuclear pore complex</i> ; Kernporenkomplex
OD	optische Dichte
ORF	engl.: <i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylen-Glykol
pH	-log [H ⁺]
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium (engl.: <i>sodium</i>) dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SV 40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA -Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA -Puffer
TE	Tris-EDTA -Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VT	Versene Trypsine
v/v	engl.: <i>volume per volume</i>
w/v	engl.: <i>weight per volume</i>

Einheiten

bp	Basenpaare
Ci	Curie
°C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
λ	lambda, Wellenlänge
l	Liter
M	molar
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
mA	Milli-Ampere
ml	Milliliter
n	nano (10^{-9})
n x g	n-fache Erdbeschleunigung
sec.	Sekunden
U	Unit
V	Volt

1. Einleitung

Die Etablierung moderner Methoden zur Handhabung rekombinanter DNA und die vollständigen Sequenzierungen mehrerer eukaryotischer Organismen durch die „Genom Projekte“ ermöglichte gerade in den letzten Jahren die Identifizierung einer großen Zahl von neuen Genen. Die Funktion einer Zelle wird über die differentielle Expression dieser Vielzahl von Genen reguliert. Störungen innerhalb dieses Regulationssystems führen nicht selten zu Funktionsverlusten innerhalb einer Zelle, die in komplexen Zellsystemen wie dem Menschen oftmals zu Anomalien bzw. Erkrankungen führen. Die Aufklärung dieser Regulationssysteme, deren zeitliche und Zellzyklus-abhängige Koordination die jeweilige Funktion einer Zelle definiert, ist zu einem der Forschungsschwerpunkte der modernen Molekularbiologie geworden.

Für die Zelle gibt es mehrere Möglichkeiten die Menge eines bestimmten Genproduktes zu regulieren. Die wohl am besten untersuchte Möglichkeit ist die Kontrolle der Transkription. Neben dieser Art der Kontrolle gibt es auch zahlreiche post-transkriptionelle Mechanismen, wie alternatives Spleißen, Regulation der Stabilität der mRNA, Regulation der Translation, Modifikation von Proteinen und Regulation des Proteinabbaus bzw. der Stabilität von Proteinen (Latchman, 1990; Ashkenas und Byers, 1997).

1.1 Regulation der Transkription in Eukaryoten

Die DNA ist in Eukaryoten als Chromatin gespeichert. Chromatin besteht aus DNA und Proteinen, welche so genannte Nukleosomen bilden, die wiederum in hochmolekularen Strukturen organisiert sind. Innerhalb dieser Komplexe sind die einzelnen Gene auf der DNA nicht durch die RNA-Polymerase oder andere Faktoren erreichbar und somit inaktiv. Während des Entwicklungsprozesses einer Zelle werden unterschiedliche Gene an- und abgeschaltet. Dieser Prozess wird durch spezifische Proteine, den so genannten Transkriptionsfaktoren, reguliert. Hierbei ist nicht ein einziger Transkriptionsfaktor für die Regulation eines spezifischen regulativen Effekts verantwortlich, sondern eine Kombination von verschiedenen, teils ubiquitären, teils zellspezifischen Regulationsfaktoren steuert das An- und Abschalten der jeweiligen Gene.

Die Zusammensetzung dieser Multi-Protein-Komplexe ist Zellzyklus- und Zelltyp-abhängig und jeweils spezifisch für die betreffenden Gene (Britten und Davidson, 1969).

Die Expressionskontrolle spezifischer Gene in Eukaryoten erfolgt durch ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen Aktivatoren, Repressoren, dem Chromatin und dem Haupt-Transkriptionskomplex. Dieser Komplex besteht aus der RNA-Polymerase II, den generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH und spezifischen Co-Aktivatoren (Orphanides *et al.*, 1996).

Die Assoziation dieses Multi-Protein-Komplexes an eine spezifische Promotor-Sequenz induziert eine Konformationsänderung der Chromatin-Struktur und ermöglicht so das Ablesen der jeweiligen DNA-Sequenz (Burley und Roeder 1996).

1.1.1 Transkriptionsaktivatoren

Transkriptionsaktivatoren sind Proteine bzw. Proteinkomplexe mit einer oder mehreren DNA-bindenden und einer oder in der Regel mehreren aktivierenden Domänen (Johnson und McKnight, 1989; Triezenberg, 1995). Über die DNA-bindende Domäne bindet der Aktivator, üblicherweise als Protein-Komplex in Kombination mit anderen Co-Faktoren, an eine spezifische DNA-Zielsequenz. Die aktivierende Domäne assoziiert direkt oder über einen weiteren Co-Aktivator mit dem Haupt-Transkriptionskomplex. Diese aktivierende Domäne kann hierbei auf dem selben Polypeptid liegen wie die DNA-bindende Domäne (Bsp. GAL4, Gill und Ptashne, 1987; GCN4, Hope *et al.*, 1988) oder auf unterschiedlichen Untereinheiten/Polypeptiden eines Multi-Protein-Komplexes. Die Verteilung dieser funktionellen Domänen auf verschiedene Komponenten eines Multi-Protein-Komplexes ermöglicht über die Variabilität seiner Zusammensetzung eine Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten (Bsp. Oct-1, Luo *et al.*, 1998).

1.1.2 Transkriptionsrepressoren

Oftmals wird die Expression durch Repressoren oder Co-Repressoren reguliert. Die genauen Mechanismen der Repression sind, vergleichend zu denen der Aktivierung, weitestgehend unklar. Ein derzeit gebräuchliches Klassifizierungssystem unterteilt die Repression in drei Klassen (Herschbach und Johnson, 1993; Hanna-Rose und Hansen, 1996). Die erste Klasse beschreibt eine Repression durch die Inaktivierung eines Aktivators. Diese Inaktivierung kann durch (1) post-translationale Modifikationen (z.B. Acetylierung von HMG-I; Munshi *et al.*, 1998), (2) durch Dimerisierung des Aktivators mit einem nicht-aktivierenden Bindepartner (z.B. Interaktion von MyoD mit I_d; Benezra *et al.*, 1990) oder durch eine (3) Konkurrenz um die DNA-Bindestelle des Aktivators oder einer direkten Repressor-Aktivator-Interaktion, welche eine Maskierung der aktivierenden Funktion bewirkt (z.B. p53-MDM2 Interaktion; Momand *et al.*, 1992), erfolgen. Die zweite Klasse beinhaltet Repressoren die mit den GTFs interagieren und dadurch die Bildung des Prä-Initiationskomplexes inhibieren. Beispiele sind die Interaktion von MOT1 und Dr2 mit dem TATA-Bindeprotein (TBP) (Wade und Jaehning, 1996; Meissner *et al.*, 2001). Diese „globalen“ Repressoren spielen wahrscheinlich eine wesentliche Rolle in der Transkriptionsregulation, wobei angenommen wird, dass einige Proteine über eine Verdrängung dieser globalen Repressoren aktivierend auf die Transkription wirken. Die dritte Kategorie beschreibt eine Repression die durch eine spezifische DNA-Sequenz und ein DNA-bindendes Protein, welches direkt die basale oder auch die aktivierte Transkription eines spezifischen Gens verringert, vermittelt wird. Derzeit wird eine direkte oder indirekte Interaktion mit dem Haupt-Transkriptionskomplex oder dem Chromatin als molekulare Grundlage dieser Art der Repression favorisiert (Hanna-Rose und Hansen, 1996).

Ein weiterer nicht in diesem Klassifizierungssystem aufgeführter Mechanismus ist die Regulation der Funktion eines Transkriptionsfaktors über dessen Konzentration. Der Transkriptionsfaktor Krüppel wirkt als Monomer aktivierend auf die Transkription. Eine Erhöhung der Konzentration innerhalb der Zelle verstärkt die Bildung von Krüppel-Dimeren, die die gleichen DNA-Zielsequenzen erkennen und sich reprimierend auf die Transkription auswirken (Sauer und Jackle, 1993).

1.2 *TRPS1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor

Die hier vorgestellte Arbeit behandelt die Funktion des *TRPS1* Genproduktes. Das *TRPS1* Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor und konnte durch positionale Klonierungs-Experimente auf Chromosom 8 in der Region 8q24.1 identifiziert werden (Momeni *et al.*, 2000). Es überspannt eine genomische Region von 260.500 bps und wird vom Telomer zum Zentromer transkribiert. Computerunterstützte Analysen der DNA-Sequenz zeigten sieben Exons und einen offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*) von 3843 bps, der am dritten Nukleotid des dritten Exons beginnt und im siebten Exon endet.

Der ORF des *TRPS1* Gens kodiert für ein aus 1281 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit einer kalkulierten „molekularen“ Masse von 141,58 kDa. Das TRPS1 Protein weist eine einzigartige Kombination von neun potentiellen Zinkfinger-Motiven vier unterschiedlicher Typen auf (Abb. 1.1). Die ersten drei Zinkfinger (Zf1 224-247, Zf2 335-358, Zf3 436-459) gehören zum C₂H₂-Typ und haben die Konsensus-Sequenz C₂X₁₄H₂, wobei die Zinkfinger vier bis sechs (Zf4 616-637, Zf5 668-689, Zf6 694-715) die Konsensus-Sequenz C₂X₁₂H₂ zeigen. Zinkfinger sieben (Zf7 896-920) gehört zur Gruppe der C₂C₂-Zinkfinger der Konsensus-Sequenz CXNCX₁₇CNXC. Datenbankanalysen dieses Zinkfinger-Motivs zeigten eine große Ähnlichkeit zur Gruppe der DNA-bindenden GATA-Zinkfinger. Durch unterschiedliche Verfahren konnte gezeigt werden, dass dieser Zinkfinger an die GATA-Konsensus-Sequenz bindet (Malik *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2002). Die beiden C-terminalen Zinkfinger (Zf8 1217-1237, Zf9 1245-1267) des TRPS1 Proteins wiesen die größte Ähnlichkeit mit den C-terminalen Doppelzinkfingern der Familie der IKAROS Transkriptionsfaktoren auf. Ein typisches Kennzeichen dieses Doppelzinkfinger-Motivs ist die Bildung von Protein-Homo- bzw. Heterodimeren innerhalb der IKAROS Familie (Sun *et al.*, 1996). In einer kürzlich erschienen Arbeit zur Analyse des Bindungsverhaltens der IKAROS Doppelzinkfinger- Domäne konnte gezeigt werden, dass ein C-terminales TRPS1-Fragment über dieses Doppelzinkfinger-Motiv zwar Homodimere aber keine Heterodimere mit anderen Proteinen der IKAROS-Familie bildet (McCarty, 2003). Der

GATA-Zinkfinger (Zf 7) des TRPS1 Proteins wird von zwei basischen Oligopeptid-Sequenzen flankiert, die als potentielle Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization signal*) NLS1 (LRRRRG, aa 886-891) und NLS2 (RRRTRKR, aa 946-952) klassifiziert wurden (Momeni *et al.*, 2002).

Vergleiche der Aminosäuresequenzen des menschlichen TRPS1 mit dem orthologen Maus- (Trps1) und dem um 10 aa kürzeren Krallenfrosch-Protein (XTrps1) zeigten eine 93%ige bzw. 73%ige Übereinstimmung (Malik *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnten innerhalb dieser TRPS1 Orthologe sowohl alle neun potentiellen Zinkfinger-Motive als auch die beiden vorhergesagten Kernlokalisierungssignale identifiziert werden. Die hier beschriebene evolutionäre Konservierung des TRPS1 Proteins unterstreicht dessen bedeutende Funktion in der Entwicklung.

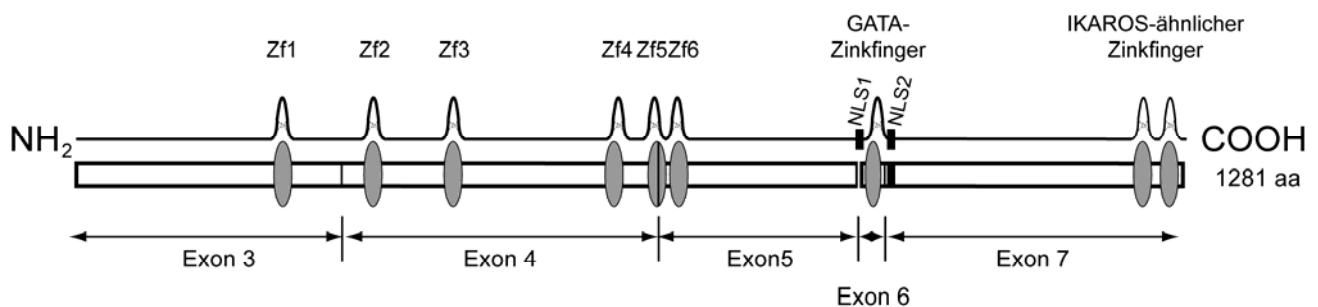


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des TRPS1 Proteins

Das TRPS1 Protein enthält neun potentielle Zinkfinger (Zf)-Motive, die hier grau dargestellt sind. Die beiden vorhergesagten Kernlokalisierungssignale flankieren den GATA-Zinkfinger (Zf7) und werden durch schwarze Vierecke symbolisiert. Am C-Terminus befindet sich der IKAROS-ähnliche Doppelzinkfinger (Zf8+Zf9). Das *TRPS1* Gen enthält 5 kodierende Exons, wobei die jeweilig kodierten Bereiche spezifisch gekennzeichnet sind.

Funktionelle Analysen ermittelten eine reprimierende Wirkung von TRPS1 auf die GATA-induzierte Transkription (Malik *et al.*, 2001). Die Verwendung unterschiedlicher TRPS1 Fragmente zeigte, dass diese reprimierende Funktion auf eine Region von 119 Aminosäuren am C-Terminus zurückzuführen ist, welche die IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger enthält. Innerhalb der Familie der IKAROS-Transkriptionsfaktoren ist dieses konservierte Zinkfinger-Motiv ebenfalls als funktionelle Domäne für die

Repression beschrieben. Es wird angenommen, dass es über die Assoziation zu anderen Proteinen an der Bildung von Proteinkomplexen am Heterochromatin beteiligt ist, die für die Deaktivierung bestimmter Gene verantwortlich sind (Kim *et al.*, 1999; Koipally *et al.*, 1999).

In einer Analyse zur Untersuchung der Regulation Androgen-abhängiger und -unabhängiger Prostata Krebszellen konnte *TRPS1*, hier als GC79 bezeichnet, als ein durch Androgene reprimierbares Gen identifiziert werden (Chang *et al.*, 2000). Untersuchungen von Krebszellen einer Ratten Prostata zeigten eine Repression des *TRPS1* Gens. Interessanterweise führte ein durch Kastration induzierter Entzug der Androgene zu einer deutlich zunehmenden *TRPS1*-Expression. Da der durch die Kastration bedingte Entzug der Androgene eine Rückbildung der Prostata durch eine verstärkte Apoptose bewirkt, wird derzeit eine mögliche Funktion des *TRPS1/GC79* Gens in der Apoptose untersucht.

1.3 Die Trichorhinophalangealen Syndrome (Typ I, Typ II und Typ III)

Mutationen innerhalb des *TRPS1* Gens oder die Deletion dieses Gens verursachen die Trichorhinophalangealen (TRP) Syndrome (Momeni *et al.*, 2000). Man unterscheidet drei Typen (Typ I (MIM 190350) Typ II (MIM 150230) und Typ III (MIM 190351)) des TRP Syndroms. Merkmale aller drei Typen sind charakteristische craniofaciale Dysmorphien und Skelettanomalien. Eine erste Beschreibung des TRP Syndroms erfolgte im Jahre 1966 durch den Radiologen Giedion (Giedion, 1966). Er beschrieb eine Patientin mit langsam wachsendem dünnem Kopfhaar, einer birnenförmigen Nase und einem langen Philtrum. Des Weiteren zeigte die Patientin eine Verkürzung der Fingerknochen und die für die TRP Syndrome charakteristischen zapfenförmigen Epiphysen an den Phalangen (Abb. 1.2). Zusätzlich zu den bereits in dieser Arbeit beschriebenen Kennzeichen sind medial buschige und lateral ausgedünnte Augenbrauen, eine schmale Oberlippe und abstehende Ohren als typische faciale Merkmale der TRP Syndrome beschrieben. Zu den Skelettanomalien zählt neben den charakteristischen Zapfenepiphysen ein generell geringeres Größenwachstum. Im Jahre 1969 beschrieb Langer eine thoraco-pelvic-phalangeale Dystrophie, die außer den

typischen TRPS Symptomen mentale Retardierung und multiple kartilaginäre Exostosen aufwies (Langer, 1969). In einer folgenden Arbeit wurde diese Erkrankung als Langer-Giedion Syndrom (LGS) oder TRPS Typ II bezeichnet und das zuerst von Giedion beschriebene Syndrom TRPS Typ I genannt (Hall *et al.*, 1974). Die Klassifizierung TRPS Typ III wurde erstmals 1986 benutzt (Niikawa und Kamei, 1986). Patienten mit TRPS III haben eine schwere Brachydaktylie und Wachstumsretardierung. Im Gegensatz zum Typ II zeigen diese Patienten keine multiplen Exostosen oder mentale Retardierung (Sugio und Kajii, 1984; Niikawa und Kamei, 1986). Weitere beschriebene Fälle von Typ III zeigten eine generelle Verkürzung aller Phalangen und Metakarpalen, wobei auch hier keine mentale Retardierung oder multiple Exostosen gefunden wurden (Nagai *et al.*, 1994; Itin *et al.*, 1996; Vilain *et al.*, 1999).

Abb. 1.2 Hand-Röntgenaufnahme eines Patienten mit TRPS I

Die Abbildung zeigt eine Röntgenaufnahme der linken Hand eines Patienten mit TRPS I. An den Epiphysen der Mittelfalangen ist die Bildung der charakteristischen zapfenförmigen Epiphysen erkennbar, die vermutlich auf eine Fehlregulation in der Chondrozyten-Reifung innerhalb der Wachstumsfuge zurückzuführen ist. Es sind verschiedene Stadien der Entstehung einer solchen Zapfenepiphyse sichtbar. Die mit „1“ markierte Position illustriert eine sehr frühe Entwicklungsstufe, wohingegen Position 2 eine späte Phase zeigt.



TRPS Typ I und Typ III werden autosomal dominant vererbt, wohingegen für Typ II bisher nur sporadische Fälle beschrieben wurden. Mutationen innerhalb des *TRPS1* Gens, die einen frühen Translations-Stop bewirken, führen zum Typ I Phänotyp (Lüdecke *et al.*, 2001). Nur wenige Fälle von TRPS I Patienten weisen zytogenetisch

sichtbare Deletionen auf. TRPS Typ II ist ein Gengruppensyndrom, bei dem sowohl das *TRPS1*- als auch das *EXT1*-Gen betroffen ist. Typ II Patienten zeigen zytogenetisch sichtbare Deletion in der Region 8q24 (Bühler und Malik, 84). Lüdecke *et al.* (2001) konnten in einer Genotyp-Phänotyp Korrelationsstudie zeigen, dass *Missense*-Mutationen innerhalb des DNA-bindenden GATA-Zinkfingers zum TRPS Typ III Phänotyp führen. Dieses Ergebnis wurde durch zwei weitere Gruppen bestätigt, die weitere *Missense*-Mutationen innerhalb des GATA-Zinkfingers und einen daraus resultierenden Phänotyp Typ III identifizierten (Kobayashi *et al.*, 2002; Hilton *et al.*, 2002).

1.4 Zielsetzung der Arbeit/Aufgabenstellung

Die Analyse der Primärstruktur des TRPS1 Transkriptionsfaktors zeigte neben einer einzigartigen Kombination von neun potentiellen Zinkfinger-Motiven vier unterschiedlicher Typen, zwei Regionen basischer Aminosäuren die als Kernlokalisierungssignale (NLS) vorhergesagt wurden. Neue, in Patienten mit TRPS I identifizierte, diese NLS betreffende Mutationen sollten *in vitro* rekonstruiert und deren Auswirkungen auf die TRPS1-Funktion untersucht werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Identifizierung von Interaktionspartnern des TRPS1 Proteins in einem Hefe Zwei-Hybrid System. Durch molekular- und zellbiologische Verfahren sollten die so ermittelten Daten verifiziert und durch die Etablierung eines funktionellen Reporter-Assays deren physiologische Relevanz analysiert werden.

2. Material und Methoden

Die nachfolgenden Arbeitsprotokolle sind den Methodensammlungen von Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook und Maniatis (1989) entnommen, wenn nicht auf andere Literaturquellen verwiesen ist.

2.1 Chemikalien, Enzyme, Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten nicht radioaktiven Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Boehringer Mannheim, Clontech, Invitrogen, Merck, New England Biolabs (NEB), Roth, Sigma, Serva, GibcoBRL, MBI Fermentas und MWG bezogen. Alle radioaktiven Chemikalien wurden von den Firmen DuPont/NEN und Amersham Pharmacia bezogen.

2.2 Häufig verwendete Lösungen

Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die Prozentangaben bei Flüssigkeiten auf v/v und bei Feststoffen auf w/v.

10x DNA-Probenpuffer:	15 %	Ficoll 400
	0,25 %	Bromphenolblau
	10 mM	EDTA (pH 8,0)
TAE:	40 mM	Tris-Acetat, pH 7,8
	1 mM	EDTA
TBE:	50 mM	Tris-Borat, pH 8,3
	4 mM	EDTA
TE:	10 mM	Tris-HCl, pH unterschiedlich: von 7,5-8,0
	1 mM	EDTA
PBS:	137 mM	NaCl
	2,6 mM	KCl
	6,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,3 einstellen	

2.3 Verwendete Größenstandards

DNA-Größenmarker: 1 kb DNA Leiter, GibcoBRL
 pUC19 *MspI* geschnitten, MBI Fermentas
 λ -DNA *HindIII* geschnitten, Boehringer

Protein-Größenmarker: vorgefärbter SDS-PAGE Standard (Broad Range), NEB

2.4 Plasmide

Hefe-Plasmide

- p414M25LexNO Expressions-Vektor, der 5' von der MCS für die *lexA* DNA-bindende Domäne (*lexA*-BD) kodiert. Die *MET25*-Promoter gesteuerte Expression des *lexA*-BD Fusionskonstruktes kann durch Zugabe von Methionin reguliert bzw. reduziert werden. Trägt *Trp1* Gen und *Amp*-Kassette.
- pVP16 Expressions-Vektor, der die kodierende cDNA für die VP16 transaktivierende Domäne unter Kontrolle eines *ADH*-Promoters trägt. Enthält *Leu2* Gen und *Amp*-Kassette.
- p415GALNVP2 Expressions-Vektor, der 5' von der MCS für die transaktivierende VP16 Domäne kodiert. *GAL1*-Promoter reguliert Expression des *VP16-Fusions-Konstruktes* (Galaktose induzierbar, Glucose reprimierbar).

Bakterielle und eukaryotische Expressionsplasmide

- pEGFP-N3 eukaryotischer Expressions-Vektor; *CMV*-Promotor reguliert die Expression der inserierten Konstrukte die am 3' mit der kodierenden Region des GFP Proteins gekoppelt sind; enthält einen Kanamycin-Resistenz-Marker und die SV40-poly(A)-Sequenz (Clontech)
- pEGFP-C1 siehe pEGFP-N3, hier für GFP-Protein kodierende Region 5' von der MCS (Clontech)
- pFlag-N3 modifizierter pEGFP-N3-Vektor; die für GFP kodierende Region gegen die für das Flag-Peptid ausgetauscht
- pcDNA3 eukaryotischer Expressions-Vektor; inserierte Sequenz wird durch einen *CMV*-Promoter reguliert; kodiert für einen Ampicillin-Resistenz-Marker und für die SV40-poly(A)-Sequenz (Invitrogen).

pBSK/ pBKS	Klonierungsvektor, IVT: T3 oder T7-Pol. (Stratagene)
pGEX-4T2	Bakterieller Expressions-Vektor; Die Expression ist unter der Kontrolle des <i>tac</i> -Promotors, welcher durch Zugabe von IPTG (Lactose-Analogen Isopropyl β -D-thiogalactoside) induziert wird (Pharmacia)
pEGFP-TOPORS	pEGFP-C1 der die vollständige cDNA der für TOPORS kodierenden Region trägt (Geschenk von E. Rubin)
pBSGC79	pBSK Klonierungsvektor der in seiner MCS die vollständige für TRPS1 kodierende cDNA trägt (Geschenk von G. Chang)

Plasmide für den Luciferase Assay

α D3	Reporterplasmid; enthält multiple <u>AGATAA</u> Sequenzen stromaufwärts zum <i>Luciferase</i> Gen
XGATA4	kodiert für den XGATA4 Transkriptionsfaktor unter Kontrolle des <i>CMV</i> -Promoters
TRPS1, LC8a, RNF4	enthalten jeweils die vollständigen cDNAs der kodierenden Regionen von TRPS1, LC8a bzw. RNF4 unter Kontrolle des <i>CMV</i> -Promoters

2.5 Oligonukleotide

siehe Anhang

2.6 Arbeiten mit DNA

2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Erzeugung von definierten DNA-Fragmenten (zwecks Klonierung) wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet. Einem 50 μ l Ansatz wurden 10 – 100 ng Plasmid DNA hinzugefügt. Der Ansatz enthielt 2,5 Units *AmpliTaq*-Polymerase, je 0,2 – 0,5 μ M eines 5' und eines 3' Oligodesoxynukleotids (Primer), 200 μ M dNTP-Mix und Reaktionspuffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % Gelatine). Der Ansatz wurde für 5 min. auf 94 °C erhitzt.

Darauf folgte folgendes PCR-Programm:

Denaturierung	15 Sekunden 95 °C
Primer-Anlagerung	15 Sekunden 50-70 °C (je nach Primer)
Polymerase-Reaktion	60 Sekunden 72 °C
Die Anzahl der Zyklen variierte zwischen 20 und 35.	

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer Länge von 5 kb wurden spezielle Polymerasen (Advanced DNA Polymerase (Clontech) und PLATINUM Taq DNA Polymerase „High Fidelity“ (Invitrogen)) verwendet und die Reaktionsbedingungen gemäß den Herstellerangaben angepasst.

2.6.2 *In vitro* Synthese von spezifischen Mutationen

Für einige funktionelle Analysen wurden unter Verwendung des QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) spezifische Mutanten hergestellt. Das hier verwendete *in vitro* System beruht auf der Verwendung spezifisch veränderter Primer in der PCR. Als Vorlage dient hierbei ein Plasmid welches die zu mutierende Sequenz enthält. Kompetente Bakterien werden anschließend direkt mit dem zirkulären PCR Produkt transformiert. Die Parameter der PCR wurden gemäß des Stratagene Handbuchs ermittelt.

Für Basensubstitutionen wurden Primer von 22 – 26 bp Länge verwendet, die im mittleren Teil die gewünschte(n) Substitution(en) aufwiesen. Um einzelne Bereiche zu deletieren wurden Primer verwendet, die an die zu deletierende Region angrenzen. Der 3' liegende Primer wurde am 5'-Ende mit einem Phosphat-Rest gekoppelt. Dieses Phosphat wird von der T4-Ligase benötigt, so dass aus dem linearen ein zirkuläres DNA-Fragment generiert werden kann.

2.6.3 Restriktionsendonukleaseverdau

Für analytische und präparative Zwecke wurde Plasmid-DNA im Verhältnis 1 µg DNA mit 20 U Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer, in 20 - 50 µl Gesamtvolumen, für 2 - 20 h bei 37 °C verdaut. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wurde dem Maßstab der Reaktion angepasst, war jedoch nie größer als 10 % des Gesamtvolumens. Somit wurde sichergestellt, dass die Enzymaktivität nicht durch eine zu hohe Glycerolkonzentration gehemmt wurde.

2.6.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

2.6.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten und einigen Restriktionsansätzen wurde das „MiniElute reaction Cleanup Kit“ (QIAGEN) gemäß der Beschreibung des Herstellers verwendet. In der Regel wurden Restriktionsansätze Phenol/Chloroform extrahiert, die DNA mit Isopropanol (70% des Gesamtvolumens) gefällt und die DNA in H₂O gelöst.

2.6.4.2 Gelextraktion nach QIAquick (QIAGEN)

DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus Agarosegelen ausgeschnitten. Zur Aufreinigung aus dem Gel wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Das Gel-Fragment wurde mit einem dreifachen Volumen Puffer QC versetzt und das Gemisch bei 50°C für 10 min. inkubiert. Der Lösung wurde anschließend ein Gelvolumen Isopropanol zugesetzt und der Ansatz auf eine QIAquick Säule pipettiert. Nach Zentrifugation (1 min., 10000 g) wurde mit 750 µl PE Puffer gewaschen und die DNA in 30 – 50 µl H₂O eluiert.

2.6.5 Ligation

In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 10-20 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen Überschuss an DNA-Fragment versetzt. Der Ansatz wurde in Gegenwart von 1 µl T4-DNA-Ligase (Roche) 1-2 h bei RT inkubiert.

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 1 – 2 %igen Agarosegelen größenspezifisch aufgetrennt. Die Agarose wurde in TAE Puffer gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE welches mit 0,5 µg/ml EtBr versetzt wurde. Den DNA-Proben wurden 10 x DNA Probenpuffer zugegeben und die Auftrennung erfolgte bei 100 – 120 V. Zur Ermittlung der spezifischen Größe der jeweiligen DNA-Fragmente dienten spezifische Größenstandards (siehe 2.3). Durch das in die DNA interkalierende EtBr konnten die DNA auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von $\lambda = 302$ nm sichtbar gemacht werden.

2.6.7 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präp)

Die durch eine Einzelkolonie (*E.coli* Stamm DH5 α oder M15(pREP4)) in LB-Medium (+ Ampicillin oder Kanamycin oder beides) angeimpften Übernachtskulturen (37 °C) wurden sedimentiert (1 min., 6000 rpm), das Pellet in 300 µl P1 Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 300 µl P2 lysiert. Versetzen mit 300 µl P3 führte zur Fällung der SDS-Protein-Komplexe. Nach einer Zentrifugation (15 min., 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 100 %igem Ethanol versetzt (7/10 des Volumen) und das DNA-Präzipitat sedimentiert (20 min., 13000 rpm). Das Pellet wurde in 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 - 50 µl H₂O aufgenommen.

Puffer P1:	10 mM	EDTA	Puffer P2:	0,2 M	NaOH
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0		1 %	SDS
	100 µg/ml	RNaseA			
Puffer P3:	3 M	Kaliumacetat			
		mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen			

2.6.8 Präparative Plasmid-Isolierung (QIAGEN-System)

Zur Gewinnung größerer Mengen gereinigter Plasmid-DNA wurde das „Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN) verwendet. Hierzu wurden 250 ml Bakteriensuspension sedimentiert und die Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die erhaltene DNA wurde in 100 – 250 µl H₂O aufgenommen.

2.6.9 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung

Die genaue Konzentration von DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und 280 nm bestimmt. Dazu wurde die DNA in Wasser verdünnt und die Absorptionen im Spektralphotometer (Ultrospec III von Pharmacia) ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Bei proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm 1,8.

Um eine ungefähre Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen wurde ein Aliquot dieser Lösung neben 12 µl des LambdaHindIII-Markers in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Konzentration konnte dann durch Vergleich der Bandenintensitäten abgeschätzt werden, da die Konzentrationen der einzelnen Banden des LambdaHindIII-Markers bekannt waren.

2.6.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit dem *PrismTM BigDyeTM TerminatorCycle ReadyReactionKit* durchgeführt. Einer 10 µl Sequenzierreaktion wurden 4 µl Terminator Ready Reaction Mix BigDye, 300 – 500 ng Plasmid-DNA als Matrize und 5 pmol des jeweiligen Primers zugesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach folgenden Parametern:

Einer initialen Denaturierung von 15 sec bei 94°C schlossen sich 35 Zyklen aus je 15 sec Denaturierung bei 95°C, 15 sec Annealing und 30 sec Elongation bei 72°C an. Abschließend erfolgte eine verlängerte Syntheseperiode von 7 min. bei 72 °C.

Die Sequenzierreaktion wurde mit 90 µl H₂O, 2 µl Dextranblau (20 mg/ml) und 10 µl Natriumacetat (3 M) und 250 µl Ethanol versetzt und gevortext. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zentrifugation (15 min. bei 13000 rpm). Die gefällten DNA Fragmente wurden zweimal mit jeweils 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend im Dunkeln getrocknet. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm „DNASStar“ (Lasergene) oder mit „Sequencher“ der Firma Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA.

2.7 Bakterien

2.7.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> DH5α	F', endA1, hsdR17, (r _k ⁻ m _k ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal ^r), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, (φ80dlacD(lacZ)M15)
<i>E.coli</i> M15 (pREP4): Uvr ⁺ ,	F ⁻ , Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , RecA ⁺ , Lon ⁺

2.7.2 Bakterienmedien

LB-Medium: 1 % NaCl
 1 % Bacto-Trypton
 0,5 % Hefe-Extrakt
 pH 7,5 mit NaOH einstellen

LB-Agar: 15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium

Ampicillin: Endkonzentration 100 µg/ml

Kanamycin: Endkonzentration 35 µg/ml

2.7.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterienzellen die DNA aus der sie umgebenen Lösung aufnehmen können (kompetente Zellen) wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode (Maniatis *et al.*, 1982) hergestellt. Hierbei wurde eine Bakterienkolonie der *E. coli*-Stämme DH5 α oder M15 (pREP4) in 10 ml ϕ a-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Trypton, 5 g MgSO₄, pH 7,6 mit KOH eingestellt) bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,3 inkubiert. Von der Kultur wurden 5 ml in 100 ϕ a-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml Gefäße überführt, die Zellen für 15 min. bei 1250 g und 4°C sedimentiert und das Sediment vorsichtig in 10 ml kaltem TbfI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8 (mit 0,2 M HAc eingestellt)) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min. auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert (15 min. bei 1250 g und 4°C) und das Sediment in 1 ml kalten TbfII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 100 μ l Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7.4 Transformation kompetenter Bakterien

5 μ l eines Ligationsansatzes oder 0,1 - 10 ng Plasmid-DNA wurden mit 50 μ l einer aufgetauten Suspension kompetenter Bakterien gemischt und 20 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 2 min. im Wasserbad bei 42 °C. Nach Zugabe von 500 μ l LB-Medium wurde der Ansatz 1 Stunde bei 37 °C unter schütteln inkubiert. Entsprechend des Selektionsmarkers des Plasmids wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.8 Hefen

2.8.1 Hefestamm

L40: MAT a, his3D200, trp1-901, leu2-3,112, ade2
 LYS:::(lexAop)4-HIS3, URA:::(lexAop)8-LacZ, gal4

2.8.2 Hefemedien

Vollmedien

YPAD: 10 g Hefe-Extrakt
 20 g Pepton
 20 g α -D-Glukose
 10 ml L-Adeninlösung (500 mg/100 ml)
 ad 1000 ml bidest Wasser

YPD: 10 g Hefe-Extrakt
 20 g Pepton
 20 g α -D-Glukose

bei Platten: 20 g/l Agar

Mangelmedien

SD-Medium: 20 g α -D-Glukose
 1,7 g Yeast nitrogen base
 5 g Ammoniumsulfat
 10 ml pro Aminosäure (je nachdem - ura, -leu, -trp, - his, - met, -ade, -
 lys/Stamm-Lsg.: 5 mg/ml)
 ad 1000 ml bidest Wasser

SRG-Medium: wie SD Medium, doch statt 20 g α -D-Glukose hier 30 g D-Galaktose
 und 20 g α -D-Raffinose

SR-Medium: wie SD Medium, doch statt 20 g α -D-Glukose hier 30 g α -D-Raffinose

bei Platten : 30 g/l Bacto-agar

Es wurden 20 ml Aminosäuren-Mix pro Liter Mangelmedium zugegeben.

Aminosäuren-Mix: 10 ml L-Arginin (HCl), 0,24 g/100 ml
 50 ml L-Aspartat, 1,2 g/100 ml
 50 ml L-Glutamat, 1,2 g/100 ml
 20 ml L-Isoleucin, 0,24 g/100 ml
 25 ml L-Phenylalanin, 0,6 g/100 ml
 25 ml L-Serin, 4,5 g/100 ml
 25 ml L-Threonin, 2,4 g/100 ml
 100 ml L-Tyrosin, 0,18 g/100 ml
 25 ml L-Valin, 1,8 g/100 ml
 10 ml L-Methionin, 0,24 g/100 ml
 (nicht bei Plasmiden mit *MET25*-Promotor)
 ad 400 ml bidest Wasser und durch 0,2 µm Filter steriltfiltriert

2.8.3 Transfektion von Hefezellen (modifiziert nach Gietz *et al.*, 1992)

Hefezellen wurden mit der Lithium-Acetat-Methode chemisch transfiziert. Dabei wurde eine 5ml Vorkultur in 60 ml Medium gegeben und bei 250 rpm und 30°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden durch 5 min. Zentrifugation bei 2500 rpm sedimentiert, in 30 ml sterilem Wasser gewaschen, anschließend in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Darauf folgend wurden die Zellen in 1 ml TE/LiAc-Puffer (0,1 M LiAc (pH 7,5), 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,001 M EDTA) gewaschen und resuspendiert. 50 µl der Hefe-Suspension wurden mit 1 µg der zu transformierenden DNA und 50 µg einzelsträngiger Lachs DNA, als Carrier-DNA, versetzt. Nach Zugabe von 300 µl 40 % PEG 4000 (in TE/LiAc-Puffer) wurde das Gemisch für 30 min. bei 30°C inkubiert und nach einer Hitzeschockbehandlung (42°C, 15 min.) auf entsprechenden Agar-Platten ausplattiert.

2.8.4 Gewinnung von Hefeextrakten

Zur Gewinnung eines Proteinextraktes aus Hefen wurde eine 3 ml Mangel-Medium-Kultur angeimpft und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3 sedimentiert (3.000 rpm, 5 min.). Das Pellet wurde in 200 µl 4x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 4x bei -80 °C

eingefroren und bei 37 °C aufgetaut. Nach einer Präzipitierung der Festbestandteile (13.000 rpm, 5 min.) wurden aus dem Überstand 40 µl durch SDS-PAGE analysiert.

2.8.5 DNA-Präparation aus Hefe

Die Hefen wurden ü.N. in Selektiv-SD-Medium inkubiert und bei 6000 rpm, 1 min. bei RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 400 µl DB-Puffer (1 M Sorbitol, 1 mM EDTA) resuspendiert und mit 40 µl Zymolase (20 mg/ml) versetzt (1 h). Die sedimentierten Zellen (6000 rpm, 1 min.) wurden nach dem gebräuchlichen Plasmid-Mini-Präparations-Protokoll (siehe 2.6.5) behandelt und in Wasser aufgenommen.

2.8.6 β -Galaktosidase Hefe-*in vivo*-Assay

Für das β -Galaktosidase-Experiment ist der Hefestamm L40 verwendet worden. Dieser beinhaltet ein im Genom integriertes *lacZ*-Gen, welches von einem minimalen *GAL4*-Promoter, der mit multiplen *lexA* Bindestellen fusioniert ist, reguliert wird.

Die Hefen wurden mit entsprechenden *lexA*-Konstrukten und *VP16*-Konstrukten transfiziert (siehe 2.8.2) und auf SD-Platten ausplattiert. Die *VP16*-Konstrukte befinden sich hier unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren *Gall*-Promoters. Für alle Experimente wurden mindestens fünf Einzelkolonien geerntet und in 3 ml SR-Medium für 2 – 3 Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden jeweils 100 µl der Kulturen in Glukose-haltigem SD-Medium zur Repression des *Gall*-Promoters überführt. Des Weiteren wurden jeweils 100 µl in ein Glukose-freies und Galaktose-haltiges SRG Medium, zur Induktion des *Gall*-Promoters des *VP16*-Plasmids, überführt. In der Regel wurde diese Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 für das folgenden Experiment verwendet: Die Hefen wurden sedimentiert und in 1,2 ml Z-Puffer resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 150 µl (= Volumen V_E) in Z-Puffer ad 1 ml in einem Eppendorfgesäß verdünnt, der Rest wurde zur Messung der Kulturdicke (OD₆₀₀) eingesetzt (100 µl Zell-Suspension und 900 µl H₂O). Nach Zugabe von 15 µl Chloroform und 10 µl einer 0,1 % SDS-Lösung wurden die Hefen durch vortexen (5 sec) aufgeschlossen, bei 30 °C äquilibriert und mit 200 µl ONPG-Lösung (vorher bei 30 °C äquilibriert) versetzt. ONPG wird durch die β -Galaktosidase

in einen gelblichen Farbstoff umgesetzt, der colorimetrisch (OD_{420}) nachgewiesen werden kann. Bei einer deutlich sichtbaren Gelbfärbung bzw. spätestens nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l 1 M Na_2CO_3 gestoppt (Messung der Reaktionsdauer t_R). Der Präzipitierung der unlöslichen Bestandteile (13.000 rpm, 10 min.) folgte eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD_{420}). Zur Kontrolle des letzten Zentrifugationsschrittes wurde stichprobenartig bei einigen Ansätzen die OD_{550} bestimmt, welche in der Regel den Wert Null hatte. Zur Kalibrierung des Photometers wurde ein kompletter Blindansatz ohne Hefesuspension eingesetzt. Der Wert für die β -Galaktosidaseaktivität errechnete sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Aktivität (U)} = \frac{1000 \times [OD_{420} - (1750 \times OD_{550})]}{OD_{600} \times V_E \times t_R}$$

Z-Puffer:	60 mM	$NaH_2PO_4 \times 7 H_2O$
	40 mM	Na_2HPO_4
	10 mM	KCl
	1 mM	$MgSO_4 \times 7 H_2O$
	50 mM	β -Mercaptoethanol
		auf pH 7,0 einstellen
ONPG:	4 mg/ml	o-Nitrophenol Galaktose
		in 0,1 M KPO_4 , pH 7,0
		sterilfiltriert und als Aliquots bei -20 °C gelagert

Die Expression der Proteine wurde mittels Western-Blot nachgewiesen.

2.9 Zellkultur

2.9.1 Zelllinien

COS-1:	Affennieren-Zelllinie, SV-40 transformiert (ATCC CRL 1650 adhären, DMEM)
COS-7:	Affennieren-Zelllinie, SV-40 transformiert (ATCC 1651, adhären, DMEM)
NIH 3T3:	Maus-Fibroblasten-Zelllinie (ATCC 1658, adhären, DMEM)
HeLa:	humane Zervixkarzinom-Epithel-Zelllinie (ATCC CCL2, adhären, DMEM)
HepG2:	humane Leberkarzinom-Zelllinie (ATCC HB-8065, adhären, DMEM)
Fibroblasten:	primäre Zelllinie (adhären, DMEM bei kurzzeitiger Kultivierung)
T48D:	humane Prostata-Krebszelllinie (adhären)

2.9.2 Zellkulturmedien

DMEM (Dulbeccos modified Eagle's Medium)

(pH 7,0)/ 4,5 g/l D-Glukose, 29,23 g/l L-Glutamin und 3,7 g/l NaHCO₃

FKS (Fötales Rinder Serum (Life Technologies))

einmalig vor Gebrauch 30 min. bei 56 °C Hitze-inaktivieren

Trypsin/ EDTA (VT):	2 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA in PBS (pH 7,2) ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺
---------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------

Penicillin/ Streptomycin	6 g/l Penicillin (Grünenthal) 10000 (µg/ml) Streptomycin in 8,0 g/l NaCl 0,4 g/l KCl 1,0 g/l Glukose 0,35 g/l NaHCO ₃
-----------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.9.3 Kultivierung der Zellen

Alle Säugerzelllinien wurden in Brutschränken bei 37 °C unter Begasung mit 5 oder 7,5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Geräte und Lösungen wurden vor der Benutzung sterilisiert.

2.9.4 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren wurde das Kulturmedium von den adhärent wachsenden Zelllinien vollständig abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die subkonfluenten Zell-Monolayer durch eine 3-5-minütige Inkubation mit VT abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde auf andere Zellkulturschalen (Nunc) verteilt. Wenn für einige Experimente eine bestimmte Zelldichte benötigt wurde, ist diese mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt worden.

2.9.5 Transiente Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte, je nach der Zielsetzung des Experimentes, durch drei unterschiedlichen Verfahren.

2.9.5.1 Calciumphosphat

Eines dieser Verfahren war die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode. Hierzu wurden 2 – 5 µg der jeweiligen Plasmid-DNA mit 6 µl 2 M CaCl₂ versetzt, in einem Gesamtvolumen von 50 µl sterilen bidest Wasser aufgenommen und nach 5 min. unter Verwirbeln tröpfchenweise zu 50 µl 2x HBS hinzugefügt. Das Gemisch wurde tröpfchenweise auf vorbereitete, in 12-well-Platten (Nunc) ausplattierte Zellen gegeben. Es schloss sich eine Inkubation bei 37 °C und 3,5 % CO₂ an. Nach 16 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit neuem Medium versetzt und bei 37 °C und 5 oder 7,5 % CO₂ für weitere 24 h inkubiert.

2x HBS:	50 mM	HEPES, pH 7,05
	280 mM	NaCl
	10 mM	KCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	12 mM	Glucose

2.9.5.2 Elektroporation

Die Methode der Elektroporation wurde für die Transfektion Säuger-Zellen angewendet, die sowohl für Expressions- also auch für Immunfluoreszenz-Studien benötigt wurden. Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit Trypanblau-Ausschluß (0,2 % Trypanblau) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Alle Transfektionsansätze einer Versuchsreihe enthielten gleiche DNA-Mengen (1 - 5 µg) und 1 – 3 x 10⁶ Zellen (Expressionsstudien) bzw. 1,5 x 10⁵ Zellen (Immunfluoreszenz) in 200 µl DMEM-Medium (ohne FKS und Antibiotika). Die Zellen wurden in Elektroporationsküvetten (0,4 cm, Invitrogen) einem Puls von 230 V/cm und 500 µF (gilt für COS-7 Zellen) oder 950 µF (gilt für NIH-3T3 Zellen) ausgesetzt und nach einer 5-minütigen Inkubation auf 6 oder 10 Ø cm Schalen (Nunc) überführt (für Immunfluoreszenz auf 12-well-Schalen). Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank (bei 37 °C und 5 oder 7,5 % CO₂) wurden die Zellen geerntet.

2.9.5.3 Transfektion mittels FuGENE (Roche)

Zum Erreichen hoher Transfektions-Effizienzen bei der Verwendung mehrerer Plasmide (für funktionelle Luciferase-Reporter Experimente), wurden HepG2 bzw. COS7 Zellen mittels FuGENE transfeziert. Hierzu wurden die entsprechenden Plasmide mit 50 µl (pro Ansatz) DMEM Medium (ohne FKS und ohne Antibiotika bzw. Antifungiziden) vermischt. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurden ebenfalls 50 µl DMEM Medium (ohne Zusätze) und die dreifache Menge an FuGENE, bezogen auf die Menge der zu transfezierenden Plasmide (w/v), zugesetzt. Es folgte das vorsichtige Überführen der in 50 µl DMEM Medium gelösten Plasmide in das FuGENE/DMEM Gemisch und eine 20 – 30-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde der Ansatz tröpfchenweise auf vorbereitete, in 6- oder 12-well-Platten ausplattierte Zellen gegeben und für 48 h bei 37 °C inkubiert.

2.9.6 Luciferase-Reporter Assay

Zur Untersuchung der potentiellen Eigenschaften der identifizierten TRPS1-Bindeproteine auf die durch TRPS1 vermittelte Repression, wurden Luciferase-Reporter Experimente durchgeführt. Die hierfür durchgeführten Transfektionen von HepG2 bzw. COS-7 Zellen erfolgten mittels FuGENE (siehe 2.9.5). Das α D3 Reporterkonstrukt enthält multiple AGATAG Sequenzen stromaufwärts zum *Luciferase* Gen (Shoichet *et al.*, 2000). In den jeweiligen Transfektionen wurden unterschiedliche Mengen (0,25 – 1 μ g) des α D3 Reporterplasmids und des für den GATA Transkriptionsfaktor kodierenden XGATA4-Plasmids verwendet. Die Menge an eingesetztem TRPS1 und dem für jeweiligen Bindepartner kodierenden Plasmid (LC8a, RNF4, TOPORS) variierte zwischen 0,25 – 1,5 μ g. Um die Menge der verwendeten DNA innerhalb eines Experiments zu normieren wurden die Ansätze bei Bedarf mit leerem Plasmid aufgefüllt.

Nach einer 48stündigen Inkubation (37 °C) der transfizierten Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in Lyse-Puffer (4 °C) aufgenommen. Ein Teil jedes Ansatzes wurde mit einem Luciferase-Puffer verdünnt (1:3, 1:5 oder 1:10) und die Luciferase-Aktivität luminometrisch gemessen (LUMAT LB9507). Jedes Experiment wurde in mindestens drei unabhängigen Versuchsdurchgängen wiederholt und die ermittelten Aktivitäten gemittelt.

Lyse-Puffer:	25 mM	Tris (pH 7,8)
	2 mM	1,2-Diaminocyclohexan- <i>N,N,N',N'</i> -tetra Essigsäure
	10 %	Glycerin
	1 %	Triton X-100
	frisch hinzugeben:	
	2 mM	DTT
	0,3 mM	PMSF
Luciferase-Puffer:	2 μ g/ml	Aprotinin
	25 mM	Glycyl-Glycine
	15 mM	K ₂ HPO ₄
	15 mM	MgSO ₄
	4 mM	EGTA
	frisch hinzugeben:	
	40 μ M	ATP
	40 μ M	DTT
	0,3 μ g/ml	Luciferin

2.9.7 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzstudien wurden 30000 - 50000 Zellen (NIH 3T3, COS-7 oder Fibroblasten) pro well (12-well-Platte) auf runde Objektträgergläschen (Ø 15 mm) ausgesät und 5-8 h später mit bis zu 8 µg DNA mittels der Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert oder 2 µg DNA bei Anwendung der Elektroporations-Methode. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Zum Nachweis endogener Proteine wurden die Zellen nur ausgesät (primäre humane Fibroblasten). Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 10 min. mit Methanol fixiert. Im Anschluss daran wurden die fixierten Zellen 2x mit PBS gewaschen, 30 min. mit Immunfluoreszenz-Puffer (I-Puffer) äquilibriert und eine Stunde mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (1:100) in 200 µl I-Puffer inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit I-Puffer wurden die Zellen mit einem entsprechenden Zweit-Antikörper (1:100) in 200 µl I-Puffer für 60 min. inkubiert. Die Kern-DNA wurde mit DAPI (200 µg/ml; 1:200) gefärbt (30 min., in 200 µl I-Puffer). Zur Konservierung wurden die Präparate mit dem Prolong Antifade Kit (Molecular Probes) eingedeckelt. Nur GFP-transfizierte Zellen wurden mit Methanol fixiert, mit PBS gewaschen, in Immunfluoreszenz-Puffer äquilibriert und in Prolong Antifade Kit eingedeckelt.

Immunfluoreszenz-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,05
100 mM NaCl
0,05 % Tween 20
0,5 % BSA (Fraktion V)

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurde ein confokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM-Mikroskop, Carl-Zeiss) verwendet.

2.10 Proteine

2.10.1 Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Die Gewinnung von Gesamtzell-Extrakten erfolgte durch die Aufnahme adhärent gewachsener Zellen in eiskaltem PBS, die mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgelöst wurden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min.) sedimentiert und in Flag-Lysis-Puffer aufgenommen.

Flag-Lysis-Puffer:	25 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	CaCl ₂
	1 %	Triton-X-100
	1:1000	DTT (1M)/ Proteinase-Inhibitoren (vor Gebrauch dazugeben)
Proteinase-Inhibitoren:	100 mg/ml	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	1 mg/ml	Pepstatin
	1 mg/ml	Bestain
	in 80 % Methanol und 20 % DMSO	
	1 mg/ml	Aprotenin
	1 mg/ml	E64
	1 M	Na ₃ VO ₄
	1 M	Na ₂ MnO ₄
	in bidest H ₂ O	

Nach Sedimentierung aller unlöslichen Zellbestandteile wurde aus dem Überstand mit 2 µl eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt (Bradford-Reagenz). Für eine Analyse durch SDS-PAGE wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 µg Protein (pro Spur) mit 4x SDS-Probenpuffer 5 min. bei 95 °C denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.10.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung (Bradford, 1976)

Es wurden jeweils 798 µl H₂O + 2 µl Proteinlösung mit 200 µl Bradford Reagenz versetzt, 5 min. bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm im Photometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) gemessen. Parallel wurde auf gleiche Weise eine

Kalibrierungskurve erstellt (BSA in H₂O). Mit Hilfe dieser Kalibrierungskurve konnte die Proteinkonzentration der unbekannten Lösung bestimmt werden.

Bradford Reagenz: 100 mg Serva Blue G
 50 ml Ethanol
 100 ml Phosphorsäure
 ad 200 ml H₂O, Lagerung bei 4 °C

2.10.3 *In vitro* Synthese von Proteinen

Zur *in vitro* Synthese wurde das "*TNTTM Coupled Reticulocyte Lysate*"-System (Promega) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Jeder Ansatz (50 µl) enthielt 25 µl Retikulozyten-Lysat, 2 µl Puffer, 1 µl Polymerase (je nach Vektor: Sp6-, T7- oder T3-Polymerase), 1 µl AS-Mix -Met, 1 µl RNasin (40 U/µl), 4 µl ³⁵S-markiertes Methionin (10 mCi/ml) und das DNA-Ausgangskonstrukt (1-2 µg). Aus diesem Ansatz wurde 1- 10 µl durch SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert.

2.10.4 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) (nach van den Bemd *et al.*, 2002)

Die Interaktion von TRPS1 zur DNA wurde durch die EMSA Technologie analysiert. Hierzu wurden jeweils 1 – 5 µl der *in vitro* synthetisierten Proteine (siehe 2.10.3) vermischt und für 30 min. bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation konnte bei Bedarf ein entsprechender Antikörper (1 µl) zugesetzt werden, der im Falle einer Interaktion zu einer der verwendeten Komponenten einen Mobilitätsshift bewirkte. Parallel dazu erfolgte die Inkubation des radioaktiv-markierten Oligonukleotids (1 µl pro Spur (40.000 cpm/µl)) in 20 µl Oligo-Puffer, der mit einem 1µg poly dIdC versetzt wurde. Im Anschluss wurden die Oligonukleotid Lösung (ca. 23 µl) mit dem Proteinansatz vermischt und für 15 min. bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte eine Auftrennung der einzelnen Gemische durch eine Gelelektrophorese (200 V, 2 h, 4°C). Anschließend wurde das Gel getrocknet und mit einem Röntgen-Film oder einer Imager-Platte für 7 – 20 Tage exponiert.

Oligo-Puffer: 40 mM KCl
 20 mM HEPES (pH 7,7)
 1 mM MgCl₂
 0,1 mM EDTA
 unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen
 0,4 mM DTT
 4 % (w/v) Ficoll

Vorbereitung der Acrylamid-Gele

2 Gele: 10 ml	5x TBE	Laufpuffer: 300 ml	5x TBE
10 ml	40 % Acrylamid/Bisacrylamid (80:1)	2700 ml	H ₂ O
80 ml	H ₂ O		
50 µl	TEMED		
250 µl	20 % APS		

Die Gele sollten vor dem Gebrauch über Nacht bei 4 °C gelagert werden.

2.10.5 Co-Immunpräzipitation von Proteinen

Zum Nachweis von Protein-Interaktionen in eukaryotischen Zellen wurden Extrakte transfizierter und nicht-transfizierter Zellen immunchemisch analysiert.

Für Co-Immunpräzipitations-Analysen in transfizierten Systemen wurden COS7-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (Elektroporation). Ein Plasmid enthielt hierbei die gesamte kodierende cDNA des TRPS1 Transkriptionsfaktors als GFP- oder Flag-Fusionsprotein. Das zweite Plasmid kodierte für den jeweils zu analysierenden Bindepartner (LC8a, RNF4 oder TOPORS). Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, abgelöst, sedimentiert (1000 rpm, 5 min.) und in Flag-Lysis-Puffer aufgenommen. Für Flag-Immunpräzipitationen wurde die "M2-affinity-gel-suspension" (Sigma-Aldrich) verwendet. Es wurden für 15 Immunpräzipitationen 500 µl "M2-affinity-gel-suspension" eingesetzt. Die Suspension wurde durch 5-maliges Waschen mit Flag-Lysis-Puffer (inklusive 0,5 % BSA) und anschließender Resuspension in 1,5 ml Flag-Lysis-Puffer äquilibriert. Es wurden zu dem jeweiligen Zellysat (100 µg Protein-Extrakt) 100 µl äquilibrierte "M2-affinity-gel-suspension" gegeben und über Nacht in einem Gesamtvolumen von 200 - 250 µl Flag-Lysis-Puffer bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min.), das Pellet 4x mit TBS-Puffer (Flag-Lysis-Puffer ohne Triton-X-100) gewaschen, in 50 - 100 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Für Co-Immunpräzipitationen von endogenen Proteinen aus Extrakten nativer Zellen (T48D, humane Fibroblasten) wurde 1 mg Gesamtprotein-Extrakt (in Inkubations-Puffer, IP-Puffer) verwendet. Die hier verwendete Protein-A-Sepharose (Amersham) wurde durch 5-maliges Waschen mit IP-Puffer und anschließender Resuspension in 1 ml IP-Puffer äquilibriert (0,1 g für 20 Reaktionen). Es wurden 30 µl der Protein-A-Sepharose Suspension dem jeweiligen Zell-Extrakt zugesetzt (30 – 60 min. Inkubation), um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurden 20 µl des jeweiligen Antikörpers zugesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 70 µl der Protein-A-Sepharose Suspension und eine erneute Inkubation bei 4°C für 60 – 90 min. Die Sepharose wurde darauf sedimentiert, 3 – 5x mit Inkubationspuffer gewaschen, in 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und zur Analyse auf ein SDS-Gel aufgetragen.

IP-Puffer:	20 mM	Tris-HCl, pH = 7,8
	100 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	0,1 %	NP40
	1:1000	DTT + Proteinase-Inhibitoren

2.10.6 Synthese rekombinanter Proteine in Bakterien

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde das Glutathion-S-Transferase System (Pharmacia) verwendet. Dieses System ermöglicht es GST-Fusionskonstrukte in Bakterien durch IPTG-Induktion zu exprimieren (GST-Vektor: Ampicillin-resistent). Nach Transformation der jeweiligen Plasmide in M15(pREP4) Bakterien (Kanamycin-resistent) wurden diese auf Amp/Kan-LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Bakterien-Kolonien abgelöst, in LB-Medium (inklusive Amp/Kan) angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD von 0,4 ist die Expression des GST-Fusionsproteines durch Zugabe von 1 – 2 mM IPTG für 2 h induziert worden. Die Bakterien-Kultur wurde sedimentiert und in 5 ml PBS/100 ml Bakterien-Kultur aufgenommen. Nach Lyse der Bakterien durch Ultraschall wurde Triton-X-100 in einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation wurde das Bakterien-Lysat (bei 6000 rpm und 4 °C für 10 min.) sedimentiert. Für 100 ml PBS-Bakterien-Suspension wurde 1 ml von der

Glutathione-Sepharose-Harz Suspension verwendet. Das Glutathione-Sepharose-Harz wurde durch einmaliges Waschen mit PBS äquilibriert und dem Überstand des Bakterien-Lysats hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min. wurde der Harz-GST-Fusions-Komplex drei Mal mit PBS gewaschen. Die an das Harz gekoppelten aufgereinigten Proteine wurden in PBS aufgenommen und konnten für weitere Experimente (z.B. Interaktionsstudien) verwendet werden.

2.10.7 Co-Präzipitation von Proteinen *in vitro*

Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden in einem Gesamtvolumen von 150-200 µl NETN-Puffer mit 4 µl ³⁵S-markierten *in-vitro* Translataten oder mit 100 µg Zellysat versetzt und 2 - 16 h bei 4°C unter Rotation inkubiert.

NETN-Puffer:	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	0,2 %	NP-40
	vor Gebrauch hinzugeben	
	1:1000	DTT/Proteinase-Inhibitoren
	0,25 mg/ml	BSA

Nach der Inkubation wurden die Proben bei 2000 rpm, 4 min. abzentrifugiert und die GST-Sedimente dreimal mit NETN-Puffer gewaschen (ohne BSA). Anschließend wurden die GST-Sedimente in 50 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

2.10.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Proteine wurden in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen (8 - 15 %, je nach Größe der Proteine) elektrophoretisch in einer Mini-Proteingelapparatur (Keutz) aufgetrennt. Alle Proteinproben wurden vorher 5 min. bei 95 °C in 4x SDS-Probenpuffer denaturiert und in 1x SDS-Laufpuffer bei 20 - 30 mA ca. 2-4 h aufgetrennt. Für den immunologischen Nachweis wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Detektion von ³⁵S-Methionin markierten Proteinen wurde das Gel anschließend für 45 min. in Fixierlösung fixiert,

Comassie gefärbt, anschließend entfärbt (mit der Fixierlösung), 2 h bei 80 °C getrocknet und über Nacht mit einem Röntgen-Film oder einer Imager-Platte exponiert.

10 % APS-Lösung:	10 %	Ammoniumpersulfat
Trenngelpuffer:	1,5 M 0,4 %	Tris-HCl, pH 8,8 SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M 0,4 %	Tris-HCl, pH 6,8 SDS
10x SDS-Laufpuffer:	1,25 M 2 M 1 %	Tris-Base Glycin SDS
4x SDS-Probenpuffer:	62 mM 2 % 10 % 5 % 5 % 0,025 %	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin DTT β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Rotiphorese Gel30:	30 % 0,8 %	Acrylamid Bisacrylamid
Fixierlösung:	10 % 30 %	Essigsäure Ethanol
Comassie-Färbelösung:	45 % 45 % 10 % 1,25 g/l	H ₂ O Ethanol Essigsäure Comassie R250

2.10.9 Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot)

Zum Transfer von Proteinen auf Nylonmembranen wurde das Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur der Firma BIO-RAD) angewendet. Dazu wurde auf der (Graphit)-Anode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: Drei Whatman 3MM-Papiere, eine Hybond C Membran (Amersham), Proteingel und abschließend drei Whatman 3MM-Papiere (alle Komponenten mit Transfer-Puffer angefeuchtet). Es wurde 1,5 bis 2 h bei 1.5 mA/cm² transferiert. Zum Nachweis der Proteine wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierlösung abgesättigt (Inkubationszeit 30 min.). Anschließend wurde der Blot mit dem 1. Antikörper in

Blockierlösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Wenn nicht anders angegeben wurden die jeweiligen Antikörper 1:1000 eingesetzt.

Die Membran wurde 4x mit PBS gewaschen und für 1 h mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper (1:5000 in Blockierlösung) bei RT inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit PBS wurde der Western-Blot entwickelt. Hierzu wurden 10 ml der ECL Entwicklerlösung mit 3,1 µl H₂O₂ (30 %) gemischt oder das Lumi-Light-Plus Western Blotting Substrat (Roche) verwendet. Der Blot anschließend für 1 min. in der aktivierten Entwicklerlösung geschwenkt und anschließend in Haushaltsfolie eingeschlagen. Ein Röntgen-Film (Fuji) wurde aufgelegt und nach 30 sec. bis 5 min. entwickelt.

Transfer-Puffer:	5,82 g/l	Tris-Base
	2,93 g/l	Glycin
	3,75 ml	10 % SDS
	200 ml	Methanol
	ad 1000 ml bidest Wasser,	

Blockierlösung:	2 %	Magermilchpulver
	in PBS	

ECL-Entwicklerlösung:	10 ml/l	ECL-A (250 mM Luminol in DMSO)
	4,45 ml/l	ECL-B (90 mM p-Coumarsäure in DMSO)
	in 100 ml	Tris/HCl, pH 8,5, lichtgeschützt
		bei RT lagern, H ₂ O ₂

3. Ergebnisse

3.1 Analysen der vorhergesagten Kernlokalisierungssequenzen im TRPS1 Protein

Nach der Genotyp-Phänotyp Korrelationsstudie von Lüdecke *et al.* (2001), konnte in zwei nicht verwandten Patienten mit TRPS I erstmalig eine *Missense*-Mutation außerhalb der für den GATA-Zinkfinger kodierenden Region des *TRPS1* Gens identifiziert werden. Diese G>A Transition an Position 2855 bewirkt einen Austausch der Aminosäure (aa) Arginin zu Histidin an Position 952 des TRPS1 Transkriptionsfaktors. Die Familie eines Patienten zeigte eine Korrelation zwischen dem TRPS I Phänotyp und der identifizierten Mutation auf (Abb. 3.1A). Durch weitere Sequenzierungen der gesamten für das Protein kodierenden *TRPS1*-Region und des nicht kodierenden zweiten Exons, konnten keine weiteren Mutationen gefunden werden. Alle betroffenen Familienmitglieder waren heterozygot für die G>A Transition, wobei nicht betroffene Mitglieder der Familie homozygot für die Wildtyp-Sequenz waren. Zur Familie des zweiten Patienten liegen derzeit keine Informationen vor. Zusätzlich konnte ein weiterer familiärer Fall (Abb. 3.1B) identifiziert werden, der eine C>T Transition an Position 2854 zeigte. Diese Transition bewirkt einen Aminosäureaustausch des Arginins 952 zu einem Cystein im TRPS1 Protein.

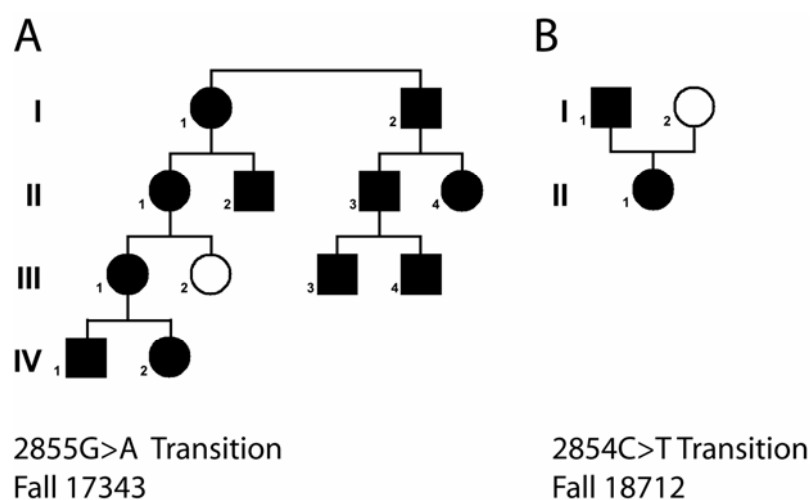


Abb. 3.1 Familien-Stammbäume der Fälle 17343 und 18712

Patienten mit TRPS I sind durch ausgefüllte Symbole dargestellt, Individuen ohne TRPS Phänotyp durch weiße Symbole.

Das Arginin 952 befindet sich an der letzten Position einer Oligopeptid-Sequenz von sieben basischen aa, die als zweites Kernlokalisierungssignal im TRPS1 Protein vorhergesagt wurde (NLS2, RRRTRKR, siehe 1.3). Um festzustellen ob ein Austausch des Arginins 952 einen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung des TRPS1 Proteins hat, wurden die *TRPS1* Wildtyp Sequenz und zwei mutierte *TRPS1*-Konstrukte (R952H und R952C) in einen pEGFP-N3 (Clontech) Expressions-Vektor inseriert (Abb. 3.2A+C). Die Erstellung der Mutanten erfolgte durch eine spezielle Mutagenese PCR-Technik, wobei das WT-TRPS1-GFP Plasmid als Matrize diente (siehe 2.6.2).

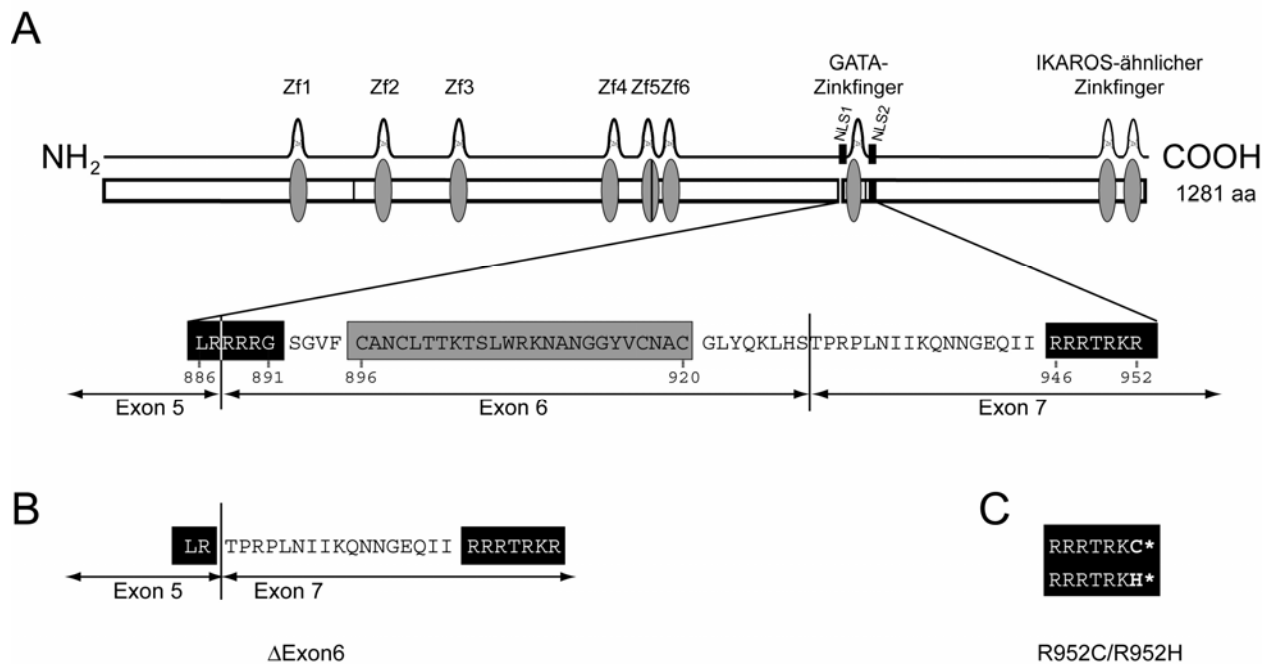


Abb. 3.2 Schematische Darstellung des Wildtyp TRPS1 und der mutanten TRPS1 Proteine

(A) Das Wildtyp Protein enthält neun potentielle Zinkfinger (Zf)-Motive, grau dargestellt, und zwei vorhergesagte Kernlokalisierungssequenzen (NLS), die durch schwarze Vierecke symbolisiert werden. (B) Dem ΔExon6-TRPS1 Protein fehlt der gesamte von Exon 6 kodierte Bereich und somit der GATA-Zinkfinger und die vier C-terminalen Aminosäuren der ersten NLS. (C) In den mutanten TRPS1 Proteinen R952C und R952H ist die letzte Aminosäure des zweiten NLS entsprechend substituiert.

NIH-3T3 und COS-7 Zellen wurden jeweils mit einem der drei *TRPS1-GFP* Fusionskonstrukte transfiziert und die intrazelluläre Verteilung in mindestens 100 Zellen mittels confokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) analysiert.

Das WT-TRPS1-GFP Protein konnte ausschließlich im Zellkern entsprechend transfizierter Zellen detektiert werden (Abb. 3.3A). Interessanterweise zeigten beide Mutanten eine völlig andere Verteilung innerhalb der Zelle als das Wildtyp-Protein. Sowohl das R952C (Abb. 3.3B) als auch das R952H Fusionsprotein (Abb. 3.3C) waren nicht mehr im Kern vorzufinden, sondern ausschließlich im Zytoplasma. Detaillierte

Analysen dieser Zellen zeigten eine ubiquitäre Verteilung der mutanten TRPS1 Proteine im Zytoplasma, wobei eine erhöhte Konzentration an der Außenseite der Kernmembran beobachtet werden konnten. Die aufgeführten Ergebnisse beweisen, dass Mutationen innerhalb des zweiten vorhergesagten Kernlokalisierungssignals (NLS2) einen Transport des TRPS1 Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern verhindern. Somit konnte NLS2 als für das TRPS1 Protein funktionelles Kernlokalisierungssignal klassifiziert werden.

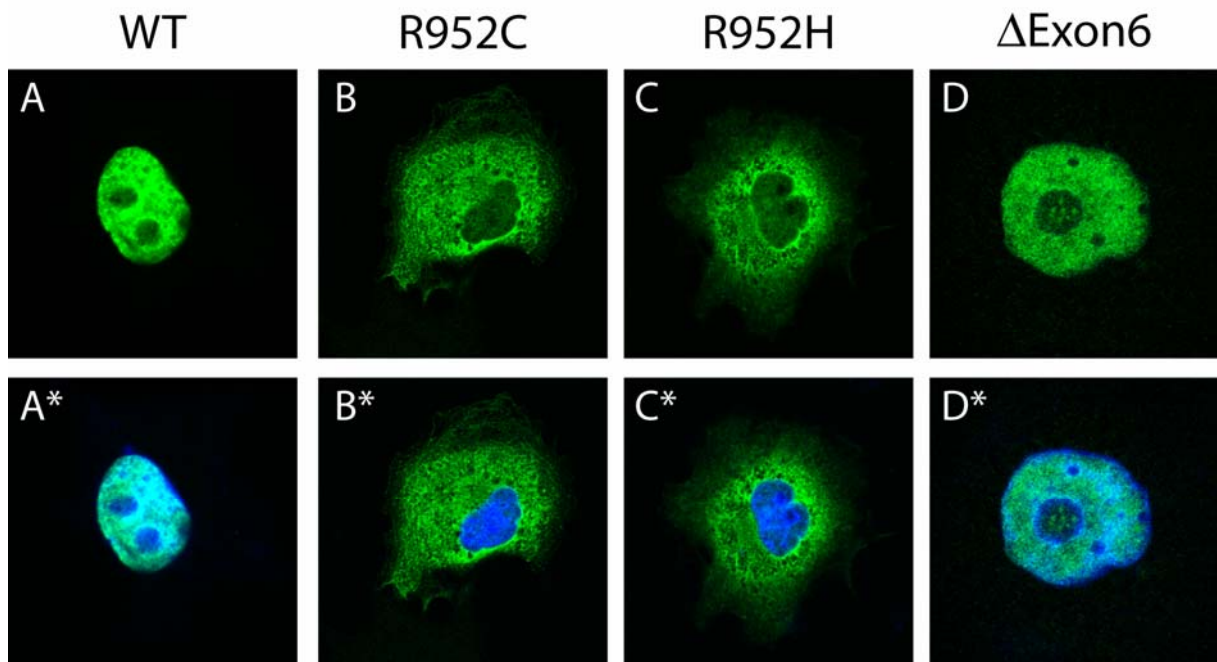


Abb. 3.3 Intrazelluläre Verteilung des TRPS1-GFP Proteins und spezifischer Mutanten in transfizierten COS-7 Zellen.

(A) Das WT-TRPS1-GFP Fusionsprotein zeigte sich im Zellkern homogen verteilt. Mutierte TRPS1 Proteine mit einer Substitution des Arginins an Position 952 zu einem Cystein (B) oder zu einem Histidin (C) wurden ausschließlich im Zytoplasma detektiert. (D) Das trunkierte Δ Exon6-TRPS1 Protein, dem der gesamte von Exon 6 kodierte Bereich fehlt, zeigte eine intrazelluläre Verteilung wie das Wildtyp Protein und konnte nur im Kern nachgewiesen werden. Die Abbildung präsentiert die mittels CLSM gewonnenen Daten, wobei die mit * markierten Abbildungen die selben Zellen mit einer zusätzlichen DAPI-Färbung der Zellkern-DNA zeigen.

Kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Mutation in der Splice-Donor Sequenz im Intron 6 (IVS6+1 G>T) identifiziert, die zu einem Überspringen des Exon 6 im Splicing-Prozess führt. Die Stabilität der somit verkürzten mRNA konnte durch RT-PCR Untersuchungen gezeigt werden (Lüdecke *et al.*, 2001). Dem von dieser mRNA kodierten Protein fehlt die 41 aa überspannende von Exon 6 kodierte Region und dadurch sowohl der DNA-bindende GATA-Zinkfinger als auch die letzten vier aa des

vorhergesagten ersten Kernlokalisierungssignals (NLS1, LRRRRG, siehe 1.3). Durch PCR *in vitro* Mutagenese wurde das *TRPS1*-Konstrukt Δ Exon6-TRPS1-GFP generiert, dem die von Exon 6 kodierte Region fehlt und damit NIH-3T3 und COS-7 Zellen transfiziert. Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation ergaben, dass das Δ Exon6-TRPS1-GFP Protein (Abb. 3.3D) ausschließlich im Kern vorzufinden war. Durch dieses Ergebnis konnte die Funktionalität des Hexapeptids LRRRRG als Kernlokalisierungssignal (NLS1) im TRPS1 Protein ausgeschlossen werden.

3.2 Identifizierung potentieller Trps1-Bindeproteine

3.2.1 Das *lexA* Hefe Zwei-Hybrid System (Fields und Song, 1989; Bartel, 1993)

Zur Identifizierung potentieller TRPS1 Bindeproteine wurde das *lexA* Hefe Zwei-Hybrid System verwendet. Da mir eine gut charakterisierte und bereits mehrfach erfolgreich eingesetzte embryonale Maus cDNA Beute-Bank (Hollenberg *et al.*, 1995) zur Verfügung stand wurde das Maus Ortholog *Trps1* verwendet, welches zu 93 % identisch mit dem humanen TRPS1 Protein ist. Die cDNA Beute-Bank enthielt nach Größe selektierte, 350 – 700 bp lange cDNA Fragmente, die an einer aus 9,5 – 10,5 Tage alten Mäuse Embryos isolierter RNA generiert und an das 3'-Ende der kodierenden Region der *VP16* aktivierende Domäne gekoppelt wurden.

Da das *Trps1* Protein mit einer Länge von 1281 Aminosäuren und einer kalkulierten molekularen Masse von ca. 141 kDa nur geringem Maße in Hefezellen gebildet werden konnte, wurden zwei überlappende *Trps1* Fragmente (F4 und F5) von ungefähr gleicher Größe als Köderproteine verwendet (Abb. 3.4). Das Fragment F4 enthält die 675 N-terminalen Aminosäuren und beinhaltet die potentiellen Zinkfinger-Motive 1 – 4. Das C-terminale Fragment F5 (*Trps1* aa 635 – 1281) beinhaltet die Zinkfinger-Motive 4 – 9 und somit den GATA-Zinkfinger als auch den C-terminalen IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger.

Sowohl das F4 als auch das F5-Konstrukt wurde jeweils in das *lexA*-Köderplasmid (p414M25LexN0) inseriert, um damit den Hefestamm L40 zu transfizieren. Durch die Insertion in das Köderplasmid wurden die *Trps1*-Konstrukte 5' mit der für die DNA-bindenden Domäne des *lexA* Proteins kodierenden Region fusioniert (*lexA-F4* bzw. *lexA-F5*). Die Expression der Fusionskonstrukte wurde durch Western-Blot Analyse

unter Verwendung eines kommerziellen α lexA Antikörpers (Santa Cruz) überprüft (Abb. 3.4B). Es wurden 20 bis 30 Hefeklone auf die Expression der Köderkonstrukte untersucht und der Klon mit der stärksten Expression des betreffenden Konstruktes in den sich anschließenden Experimenten verwendet.

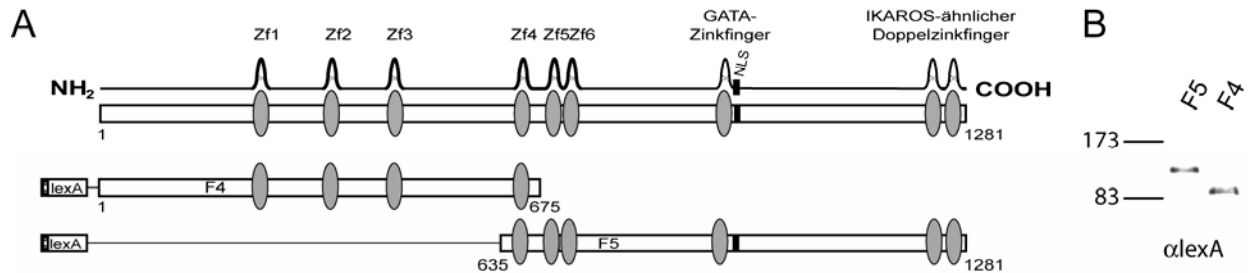


Abb. 3.4 Schematische Darstellung und Expression der im Hefe Zwei-Hybrid System verwendete Trps1-Konstrukte

(A) TRPS1 enthält 1281 Aminosäuren und 9 potentielle Zinkfinger (Zf) Motive. C-terminal zum DNA-bindenden GATA-Zinkfinger (Zf7) konnte ein Kernlokalisierungssignal (NLS) identifiziert werden. Die im Hefe Zwei-Hybrid System verwendeten Trps1 Fragmente (F4 und F5) wurden am N-Terminus mit der DNA-bindenden Domäne des lexA Proteins fusioniert. (B) Zeigt die durch einen α lexA Antikörper detektierten Fragmente F5 und F4 in Extrakten entsprechend transfizierter Hefen.

Die jeweiligen Hefe-Klone wurden nun nach einer modifizierten LiAc-Methode (Gietz *et al.*, 1992) mit der cDNA Beute-Bank transfiziert und auf Histidin-defizienten Agarplatten ausplattiert. Aliquots der Hefekulturen wurden gleichzeitig auf Histidin-haltigen Medien ausplattiert, um die primäre Transfektionseffizienz überprüfen zu können. Die Transfektionsrate konnte dadurch auf $1,55 \times 10^6$ (für *lexA-F4*) bzw. auf $1,65 \times 10^6$ (für *lexA-F5*) determiniert werden, was eine Repräsentierung der gesamten Beute-Bank gewährleistet.

Auf den Histidin-freien Medien konnten nach einer Inkubationszeit von 2,5 Tagen insgesamt 28 Einzelkolonien identifiziert werden. Fünf dieser Kolonien wurden für das Köderkonstrukt *lexA-F4* und 23 für das Konstrukt *lexA-F5* gefunden. Die Kolonien wurden einzeln kultiviert, die Plasmid-DNA isoliert und damit anschließend kompetente DH5 α Bakterien transformiert. Unter Verwendung eines spezifischen VP16 Oligonukleotides wurden die einzelnen Beute-Plasmide sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mittels Computeranalysen (NCBI, BlastN- und BlastP-Homologiesuche) charakterisiert.

Für das N-terminale Trps1 Fragment F4 konnte dadurch ein potentieller Bindepartner ermittelt werden. Drei der fünf identifizierten Hefeklone kodierten für das Fragment aa 137-207 (von 357) des Poly(rC)-bindenden Proteins 1 (Pcbp1). Eine Analyse der zwei anderen Beute-Plasmide konnte keine ORFs und somit keine weiteren Bindekandidaten identifizieren.

Die Auswertung der 23 Hefeklone für das C-terminale Trps1 Fragment F5 ergab sechs unterschiedliche potentielle Bindeproteine. Eines der Beute-Plasmide kodierte für das Fragment 385-524 (von 793) des Proteins Punc (putatives neuronales Zelladhäsions Molekül). Jeweils zwei Plasmide kodierten für einen Teil (aa 352-505 von 990) des zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschriebenen Proteins Arkadia und ein Fragment (aa 930-1006 von 1045) des Topoisomerase I bindenden RS-Proteins (Topors). Jeweils drei Hefeklone beinhalteten Plasmide die Teile (aa 1-89 von 601) des Ataxin-1 Bindeproteins (A1up) und des RINGfinger Proteins 4 (Rnf4) enthielten. Die für Fragmente des Rnf4 Proteins kodierenden Plasmide enthielten zwei überlappende Fragmente. Eines der Plasmide kodierte die Region aa 1 – 130 des Rnf4 Proteins, die beiden anderen Plasmide kodierten den Bereich aa 6 – 65, welcher komplett im kodierten Bereich des ersten Plasmids (aa 1 – 130) enthalten ist. Zwölf der 23 Hefeklone enthielten die gesamte kodierende Region des Proteins Lc8a (dynein light chain 8), wobei drei dieser zwölf Klone ein Insert mit einer Länge von 369 bp und neun eines von 571 bp Länge bargen.

3.2.2 Verifizierung der Hefe Zwei-Hybrid Daten durch ein induzierbares Hefe *in vivo* System

Zur Verifizierung der Hefe Zwei-Hybrid Daten wurde ein weiteres Hefe *in vivo* Interaktionssystem verwendet. Die Mehrzahl (sechs von sieben) der potentiellen Trps1 Bindepartner konnten mit dem C-terminalen Fragment F5 identifiziert werden. Dieses Fragment enthält neben dem DNA-bindenden GATA-Zinkfinger, die verifizierte NLS und den IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger und somit alle bisher beschriebenen funktionellen Regionen. Die im weiteren Teil dieser Arbeit aufgeführten Experimente beschreiben die Analysen der Trps1-Interaktionen mit den für Fragment F5 gezeigten Bindekandidaten.

Es wurden erneut Trps1 Fragmente mit der DNA-bindenden Domäne des lexA Proteins gekoppelt und als Köder eingesetzt. Durch die Erstellung zusätzlicher Trps1 Köder-Fragmente wurden die Binderegionen des Trps1 Proteins für die jeweiligen Interaktionspartner eingegrenzt. Das Fragment F6 (Trps1 aa 635 – 1184) ist eine C-terminale Verkürzung des bereits beschriebenen Fragmentes F5, dem der IKAROS-ähnliche C-terminale Doppelzinkfinger fehlt. Das Fragment F9 (aa 635 – 984) ist eine weitere C-terminale Verkürzung des Fragmentes F6. Dem Fragment F10 (aa 635 – 819) fehlt neben dem IKAROS-ähnlichen Motiv auch der DNA-bindende GATA-Zinkfinger. Fragment F1 kodiert für die C-terminalen 100 aa des Trps1 Proteins (1182 – 1281) und Fragment F13 überspannt eine Region von 458 aa (aa 724 – 1181), zwischen den Zinkfinger-Motiven 6 und 8 (siehe Abb. 3.5). Als Beutekonstrukte dienten die im Hefe Zwei-Hybrid System identifizierten Fragmente der potentiellen Bindepartner, die über einen PCR-Schritt mit für das Beute-Plasmid spezifischen Primern in einen induzierbaren VP16 Vektor (p415GALNVP2) integriert wurden. In diesem Plasmid steht die Expression des *VP16-Beute* Fusionskonstruktes unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren *Gall*-Promoters (siehe 2.8.5).

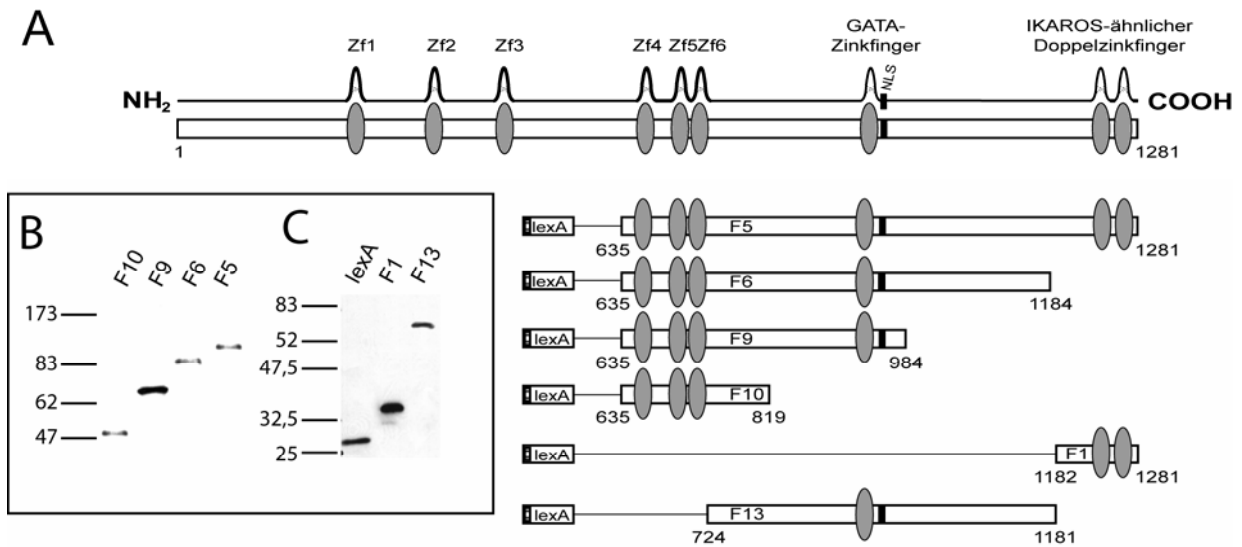


Abb. 3.5 Schematische Darstellung und Expression der *lexA* Köderkonstrukte

(A) Schematische Darstellung des Trps1 Proteins und der in einem Hefe *in vivo* System verwendeten Trps1 Fragmente. (B + C) Zellextrakte transfizierter L40 Hefezellen wurden mit einem *alexA* Antikörper auf die Expression der Köderkonstrukte hin untersucht. Die Funktion des *alexA* Antikörpers wurde an einem *lexA* Protein-Lysat überprüft (C, Spur 1).

Der Hefestamm L40 wurde mit den jeweiligen *lexA-Trps1*-Konstrukten und den für die spezifischen VP16-Bindepartner kodierenden Plasmiden co-transfiziert. Die Expression der Fusionskonstrukte wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung kommerzieller *alexA*- bzw. α VP16-Antikörper (Santa Cruz) überprüft (Abb. 3.5B+C). Im Falle einer Interaktion von Beute- und Köderfragment kam es zur Aktivierung der Expression des im Hefegenom integrierten *lacZ* Gens, welches unter der Kontrolle von acht in Reihe geschalteter *lexA*-Operatoren steht. Die Aktivität der vom *lacZ* Gen kodierten β -Galaktosidase konnte durch Zugabe des synthetischen Farbstoffs ONPG photometrisch gemessen werden.

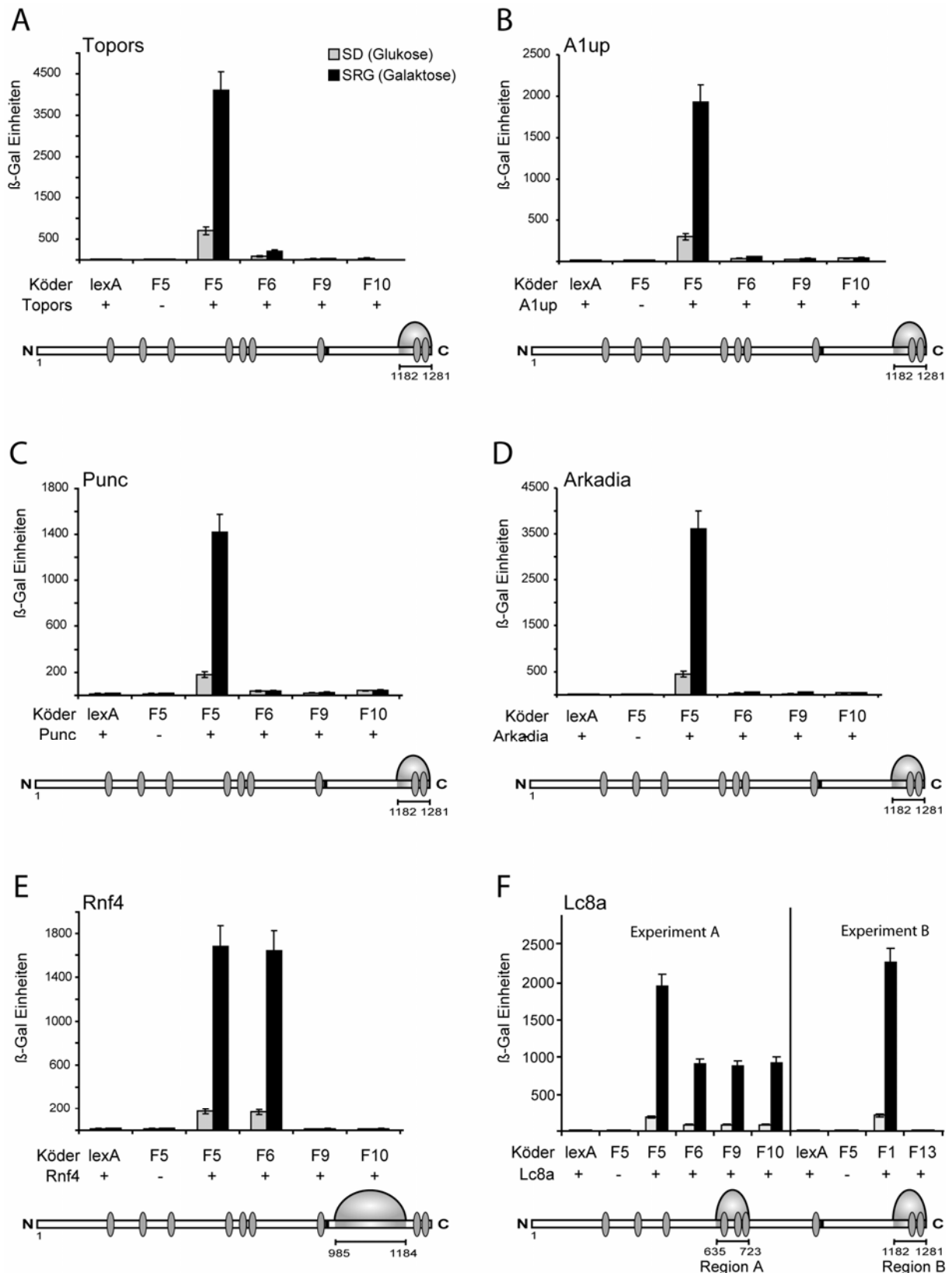


Abb. 3.6 Verifizierung der Hefe Zwei-Hybrid Daten und Identifizierung der jeweiligen Binderegionen im Trp1 Protein.

Die Abbildung stellt das Bindeverhalten der jeweiligen Trp1 Fragmente zu den entsprechenden Bindeproteinen dar. Die grauen Balken zeigen die ermittelte β -Galaktosidase-Aktivität unter nicht induzierten und die schwarzen Balken unter induzierten Bedingungen. Der untere Teil jeder Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Trp1 Proteins mit der jeweilig identifizierten Binderegion.

Die Auswertung der so ermittelten Daten ergab, dass die Proteine Topors (aa 930-1006), A1up (aa 1-89), Punc (aa 385-524) und Arkadia (aa 352-505) mit dem Trps1 Fragment F5 eine deutliche Interaktion zeigten. C-terminale Verkürzungen des Fragmentes F5 (also F6, F9 und F10) führten dabei zum Verlust dieser Interaktionen (siehe Abb. 3.6A – D). Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zu vier potentiellen Bindeproteinen (Topors, A1up, Punc, Arkadia) ausschließlich über die C-terminalen 100 aa des Trps1 Proteins erfolgte. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden die vier entsprechenden Beutekonstrukte mit dem *Trps1*-Konstrukt F1 co-transfiziert. In allen vier Versuchsansätzen konnte eine Interaktion des F1 Fragmentes zu den einzelnen Bindeproteinen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Das Rnf4 Protein zeigte sowohl Interaktionen zum Trps1 Fragment F5 als auch zum Fragment F6, wobei die Fragmente F9 und F10 keine Interaktionen zeigten (Abb. 3.6E). Damit konnte die Rnf4-interagierende Region innerhalb des Trps1 Proteins auf einen Bereich von 200 aa (Trps1 aa 985 – 1184) eingegrenzt werden, der kein potentiell Zinkfinger-Motiv enthält. Lc8a zeigte Interaktionen mit den Fragmenten F5, F6, F9 und F10, wobei die stärkste Bindung zum Fragment F5 gefunden wurde (Abb. 3.6F, Experiment A). Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass vier der fünf anderen Proteine im IKAROS-ähnlichen Bereich von Trps1 interagierten, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Konstrukte F1 und F13 mit dem *VP16-Lc8a*-Konstrukt co-transfiziert und erneut die β -Galaktosidase-Aktivität ermittelt (Abb. 3.6F, Experiment B). Es zeigte sich auch hier eine Interaktion zum IKAROS-ähnlichen Bereich (Fragment F1). Das Fragment F13, welches die Region zwischen F10 und F1 überspannt (Trps1 aa 724 – 1181), zeigte keine Interaktion. Somit konnten zwei einzelne Regionen im Trps1 Protein die eine Bindung zu Lc8a zeigten identifiziert werden. Region A überspannt die aa 635 bis 723 und beinhaltet die drei potentiellen Zinkfinger-Motive Zf 4 – 6. Region B überspannt die letzten 100 aa (1182 – 1281) und enthält den IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger.

3.2.1.1. Analysen zur Bildung von TRPS1 Homodimeren

Eine der charakteristischen Eigenschaften des IKAROS-Doppelzinkfingers ist die Bildung von Homodimeren. Obgleich der hohen Homologie des C-terminalen Trps1-Doppelzinkfingers (Zf 8+9) zum IKAROS-Doppelzinkfinger, konnte in den hier durchgeführten Hefe Zwei-Hybrid Experimenten kein für Trps1 kodierender Hefe-Klon identifiziert werden. In zusätzlichen Hefe *in vivo* Analysen sollte die Bildung von Trps1-Homodimeren untersucht werden. Dazu wurden Hefen jeweils mit dem *F1-lexA*- oder dem *F5-lexA*-Konstrukt und dem *VP16-F1*-Konstrukt co-transfiziert. Eine Überprüfung der Expression der jeweiligen Fusionskonstrukte erfolgte durch Western-Blot Analysen. In keinem der durchgeführten Experimente konnte eine Interaktion der verwendeten Fragmente nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.2.3 *in vitro* Analysen der Trps1 Interaktionen

In weiteren biochemischen Experimenten sollten die in Hefe-Systemen identifizierten Interaktionen von Trps1 verifiziert werden. Hierzu wurden die Trps1-Konstrukte F6, F9 und F10 in das Plasmid pcDNA3 integriert. Die Synthese der trunkierten Trps1 Proteine erfolgte in einem Retikulozyten-Lysat unter Verwendung einer radioaktiven ³⁵S Methionin-Quelle und wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Röntgenfilm Analyse überprüft (Abb. 3.7).

Konstrukte der spezifischen Fragmente potentieller Trps1-Bindepartner wurden durch die Insertion in das Plasmid pGEX-4T2 am 5'-Ende mit dem *GST* Gen fusioniert. Es folgte eine Transformation des bakteriellen Expressionsstamms M15 (pREP4) mit den jeweiligen GST-Fusionskonstrukten, deren Expression durch IPTG induziert wurden. Lysate der entsprechenden Bakterien wurden mit einem Glutathion-Sepharose-Harz inkubiert, wodurch die GST Fusionsproteine an die Harze gekoppelt wurden. Es schloss sich eine Zugabe der *in vitro* synthetisierten und radioaktiv markierten Trps1 Fragmente an. Darauf folgte die Analyse der Glutathion-Sepharose-Harze mittels SDS-PAGE und Autoradiographie (Abb. 3.7).

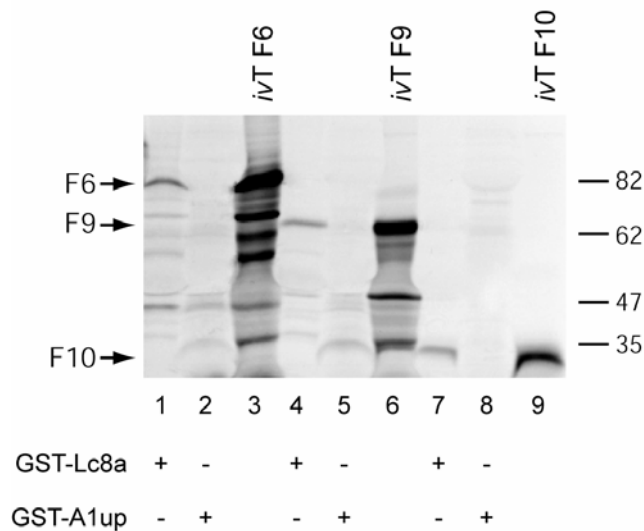


Abb. 3.7 *in vitro* Experiment zur Analyse der Interaktion von Trps1 zu Lc8a und A1up

GST-Lc8a und GST-A1up Fusionsproteine wurden an ein Glutathion-Sephrose-Harz gekoppelt und mit *in vitro* synthetisiertem und radioaktiv markierten Trps1 Fragmenten inkubiert. Die erfolgreichen Synthesen der Fragmente F6 (Spur 3), F9 (Spur 6) und F10 (Spur 9) wurden einzeln überprüft. An der mit GST-Lc8a gekoppelten Matrix konnten alle Trps1 Fragmente identifiziert werden (Spuren 1, 4 + 7), wohingegen kein Trps1 Fragment an den mit GST-A1up beladenen Harzen detektiert werden konnte (Spuren 2, 5 + 8).

Wie bereits in den Hefe-Systemen ermittelt werden konnte (siehe 3.2.2) zeigte das GST-Lc8a Fusionsprotein eine Interaktion zu den Trps1 Fragmenten F6, F9 und F10 (Abb. 3.7). Das GST-Rnf4 Protein konnte hier leider nicht analysiert werden, da es nicht möglich war ausreichende Mengen des GST-Rnf4 Fusionsproteins an das Glutathion-Sephrose-Harz zu koppeln. Die GST Fusionsproteine GST-A1up (Abb. 3.7), GST-Punc, GST-Topors und GST-Arkadia zeigten, wie in den bereits beschriebenen Hefe-Systemen, keine Interaktion zu den hier verwendeten Trps1 Fragmenten. Die mit diesen Proteinen interagierende Region in Trps1 wurde auf die C-terminalen 100 aa eingegrenzt (siehe 3.2.2). Da es hier nicht möglich war Trps1 Fragmente dieser Region (F5 und F1) erfolgreich *in vitro* zu synthetisieren, konnten die für diese Proteine in den Hefe-Systemen ermittelten Daten nicht eindeutig verifiziert werden.

3.3 Analyse der TRPS1 Protein-Protein Interaktionen in Säugerzellen

Alle bisher beschriebenen Untersuchungen wurden mit den murinen Orthologen der jeweiligen Proteine durchgeführt. Für alle sich anschließenden Experimente wurden ausschließlich die humanen Orthologe verwendet. Im Rahmen der hier vorgestellten Promotionsarbeit konnten bisher drei der identifizierten TRPS1-Bindekandidaten (RNF4, LC8a und TOPORS) untersucht werden.

Um die physiologische Relevanz der unterschiedlichen Protein-Protein Interaktionen zu untersuchen mussten zuerst die in Hefe- und *in vitro* Systemen gefundenen Daten in Säuger-Zellsystemen verifiziert werden. Die vollständigen cDNAs der kodierenden Regionen von LC8a und RNF4 wurde durch PCR an einer fetalen Gehirn cDNA-Bank (Clontech, cat. #7402-1) generiert und in das Plasmid pFLAG-N3 inseriert, wohingegen die cDNAs von TRPS1 und TOPORS in die Plasmide pFLAG-N3 und pEGFP-N3, bzw. pEGFP-C (Clontech) integriert wurden.

3.3.1 Die Interaktion von TRPS1 und LC8a

3.3.1.1 Expression und Co-Immunpräzipitierung

Um die Interaktion von TRPS1 und LC8a zu zeigen wurden COS-1 Zellen mit dem *TRPS1-GFP* und dem *LC8a-Flag* Plasmid oder einem der Plasmide und dem entsprechenden leeren Plasmid co-transfiziert. Die Expression der Fusionskonstrukte wurde durch Western-Blot Analysen unter Verwendung eines α TRPS1 Antiserum (SN552/SN653, siehe Chang *et al.*, 2002) bzw. eines α Flag Antikörpers (Santa Cruz) überprüft. Sowohl das LC8a-Flag Protein (Abb. 3.8A) als auch das TRPS1-GFP Protein (Abb. 3.8B) konnte nur in den jeweils spezifisch transfizierten bzw. co-transfizierten Zellen gezeigt werden. Um die Interaktion der beiden Fusionsproteine zu überprüfen wurden die Zellextrakte mit einer M2- α Flag-Sepharose inkubiert und anschließend mittels Western-Blot Analyse untersucht. In den Extrakten aus *TRPS1-GFP+LC8a-Flag* co-transfizierten Zellen konnte ein deutliches TRPS1-GFP Signal gefunden werden (Abb. 3.8C, Spur 4). Kein Kontroll-Experiment zeigte ein TRPS1-Signal (Abb. 3.8C, Spuren 1–3), wodurch unspezifische Interaktionen der Fusionsproteine zu einer der verwendeten Komponenten ausgeschlossen werden konnten.

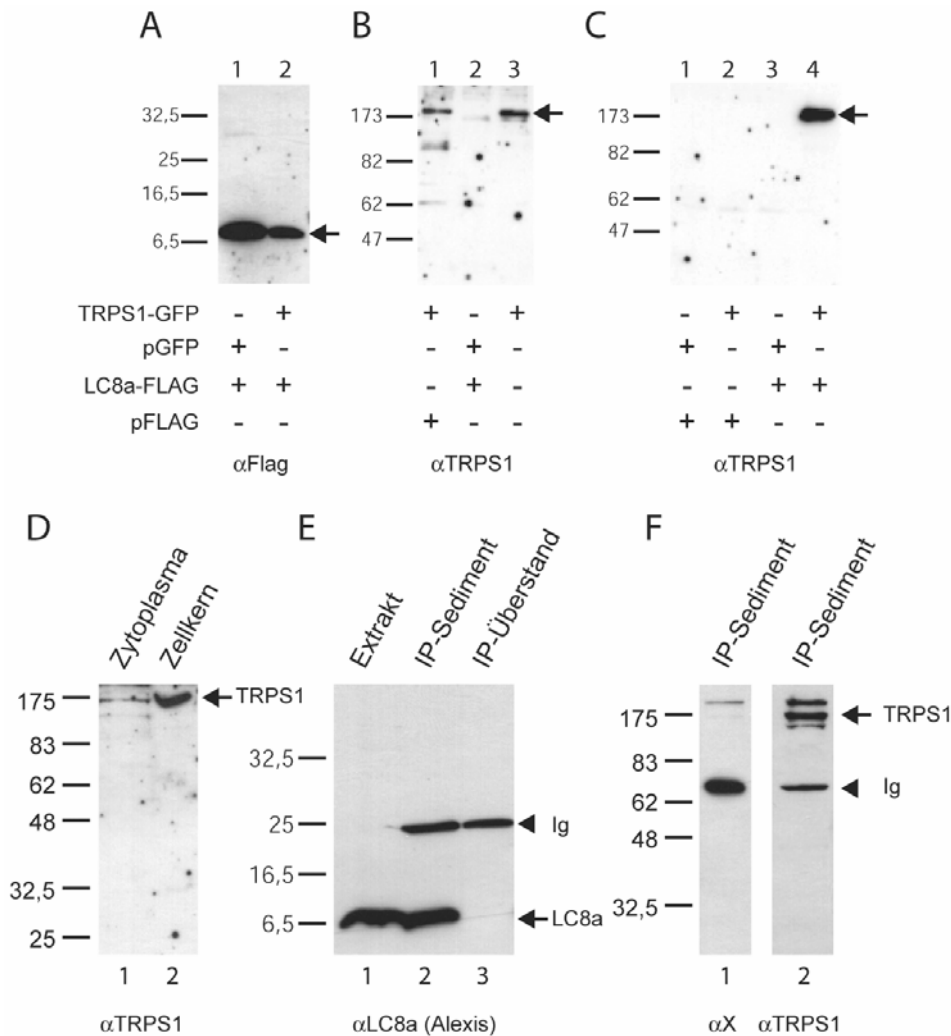


Abb. 3.8 Expressionen und Co-Präzipitierung von TRPS1 und LC8a

Die Expression der *TRPS1-GFP* und *LC8a-Flag*-Konstrukte wurde in Zellextrakten transfizierter COS-1 Zellen mittels Western-Blot Analysen überprüft. (A) Das LC8a-Flag Protein konnte durch die Verwendung eines α Flag Antikörpers in mit leerem pGFP (Spur 1) oder *TRPS1-GFP* (Spur 2) co-transfizierten Zellen detektiert werden. (B) Das TRPS1-GFP Fusionsprotein konnte durch ein α TRPS1 Antiserum (SN652) in *LC8a-Flag* (Spur 1) oder pFlag (Spur 3) co-transfizierten Zellen nachgewiesen werden. (C) TRPS1-GFP und LC8a-FLAG konnten in spezifisch transfizierten COS-1 Zellen co-präzipitiert werden. Die Immunpräzipitierung wurde durch die Verwendung einer M2- α Flag-Matrix durchgeführt. Die so erhaltenen Präzipitate wurden anschließend mit dem α TRPS1 Antiserum auf das Vorhandensein des TRPS1-GFP Fusionsproteins untersucht. Die Spuren 1 und 2 sind Negativ-Kontrollen in denen ein leeres pFlag Plasmid verwendet wurde, um unspezifische Interaktionen des TRPS1-GFP Proteins mit der M2- α Flag-Matrix ausschließen zu können. Als zusätzliche Kontrolle wurden Präzipitate von *LC8a-Flag*+pGFP co-transfizierten Zellen untersucht (Spur 3). Ein deutliches TRPS1-GFP Signal konnte nur in *TRPS1-GFP*+*LC8a-Flag* co-transfizierten Zellen gefunden werden (Spur 4).

(D, E) Die Expression von *TRPS1* und *LC8a* konnte in Extrakten primärer humaner Fibroblasten gezeigt werden. Die jeweiligen Banden sind durch Pfeile spezifisch gekennzeichnet. (D) TRPS1 konnte durch die Verwendung des α TRPS1 Antiserums sowohl in der Zellkern-Fraktion (Spur 2) als auch in der zytoplasmatischen Fraktion (Spur 1), hier als wesentlich schwächeres Signal, nachgewiesen werden. Jede der Spuren wurde mit 50 μ g Gesamtprotein beladen. (E) LC8a wurde durch einen α LC8a Antikörper (Alexis) detektiert (Spur 1). Spur 2 zeigt die Analyse eines Aliquots des α LC8a-Präzipitates und die erfolgreiche LC8a-Fällung durch den α LC8a Antikörper. Die dritte Spur zeigt ein Aliquot des Überstandes, um die Effizienz der Präzipitierung zu prüfen. (F) TRPS1 konnte im IP-Sediment durch das α TRPS1 Antiserums gezeigt werden (Spur 2), wobei die zusätzlichen Banden durch die Verwendung eines irrelevanten Antiserums als unspezifisch klassifiziert werden konnten. Die detektierten Immunglobulin Seitenketten (Ig) des α LC8a IgM Antikörpers wurden entsprechend gekennzeichnet.

Durch die Verwendung des α TRPS1 Antiserums und kommerzieller α LC8a Antikörper (Alexis und Santa Cruz) in Western-Blot Analysen, konnten sowohl das TRPS1 (Abb. 3.8D) als auch das LC8a Protein (Abb. 3.8E, Spur 1) in Extrakten primärer humaner Fibroblasten gefunden werden. Eine anschließende Trennung der Kern- und zytoplasmatischen Fraktionen dieser Extrakte zeigte, dass das TRPS1 Protein vorwiegend im Kern (Abb. 3.8D, Spur 2) vorkommt, doch auch in geringerer Intensität im Zytoplasma nachweisbar ist (Abb. 3.8D, Spur 1).

Um die Interaktion beider Proteine unter nativen Bedingungen zu untersuchen wurden Zellextrakte mit einem α LC8a Antikörper (Alexis) inkubiert, mehrmals gewaschen und mittels Western-Blot Analyse untersucht (siehe 2.10.5). Durch die Verwendung des α LC8a Antikörpers konnte das erfolgreiche Präzipitieren des LC8a Proteins bestätigt werden (Abb. 3.8E, Spur 2). Die Analyse eines Aliquots des Überstandes zeigte kein LC8a Signal, was als Indikator für eine effiziente Präzipitierung gilt (Abb. 3.8E, Spur 3). Eine Untersuchung des α LC8a Präzipitats mit Hilfe des α TRPS1 Antiserums konnte TRPS1 als co-präzipitiertes Protein ermitteln (Abb. 3.8F, Spur 2), wobei die Verwendung eines irrelevanten Antiserums kein Signal im Größenbereich von TRPS1 zeigte (Abb. 3.8F, Spur 1).

Der TRPS1-LC8a Komplex wurde sowohl unter transfizierten als auch unter nativen Bedingungen in Säugerzellen nachgewiesen, was auf eine physiologische Relevanz hindeutet.

3.3.1.2 Intrazelluläre Verteilung von TRPS1 und LC8a

In weiteren Experimenten wurde die intrazelluläre Verteilung der durch Immunfluoreszenz markierten Proteine TRPS1 und LC8a untersucht. Hierzu wurden NIH-3T3 Zellen mit den Fusionskonstrukten *TRPS1-GFP* und *LC8a-Flag* transfiziert und die intrazellulären Lokalisationen der Proteine mittels CLSM analysiert.

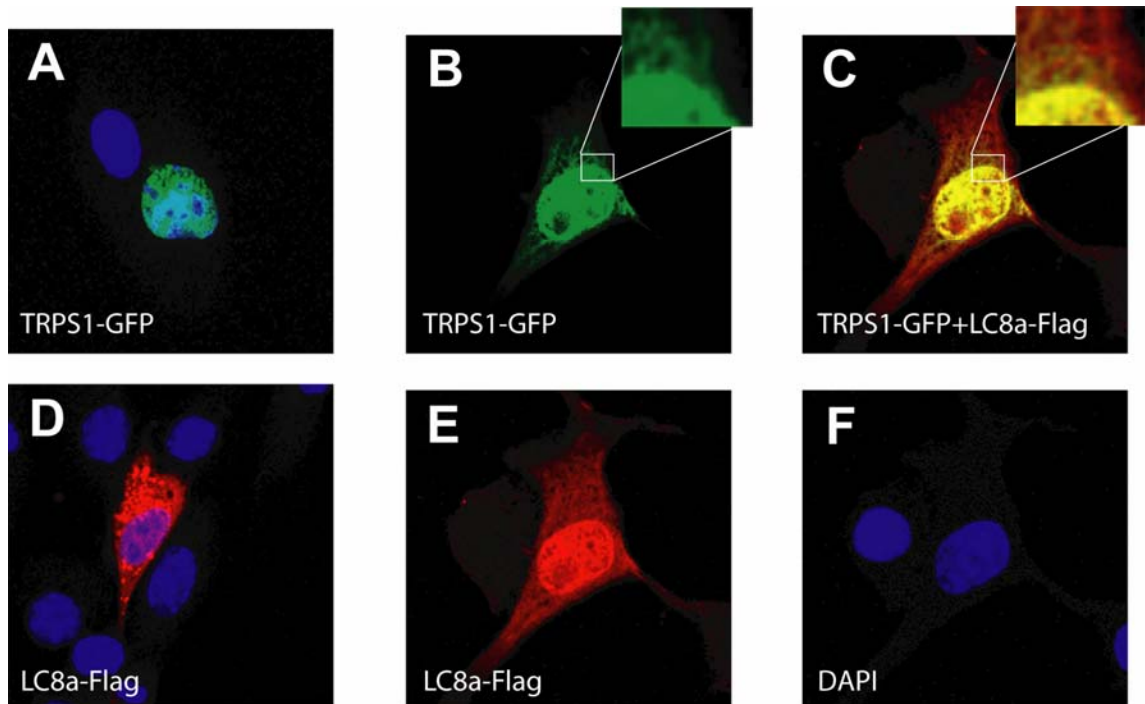


Abbildung 3.9 Intrazelluläre Lokalisierung von TRPS1 und LC8a in transfizierten NIH-3T3 Zellen

NIH-3T3 Zellen wurden mit dem *TRPS1-GFP* und *LC8a-Flag* Konstrukt transfiziert. Das TRPS1-GFP Genprodukt fluoresziert grün und das LC8a-Flag Protein wurde durch die Verwendung eines Maus α Flag und eines Rhodamin-gekoppelten anti-Maus Antikörpers rot dargestellt. Die Nuklei wurden durch DAPI blau angefärbt. (A) TRPS1-GFP ist in nicht co-transfizierten Zellen ausschließlich im Zellkern nachweisbar. Es ist dort homogen verteilt. (D) LC8a ist in nicht *TRPS1-GFP* co-transfizierten Zellen fast ausschließlich zytoplasmatisch, wobei es eine homogene Verteilung zeigt. (B) In *TRPS1-GFP+LC8a-Flag* co-transfizierten Zellen ist TRPS1 noch immer hauptsächlich im Zellkern zu finden, es konnte nun allerdings auch im Zytoplasma gezeigt werden. TRPS1 bildet hierbei eine Art Konzentrationsgradienten um den Zellkern. (E) LC8a ändert seine intrazelluläre Verteilung unter diesen Bedingungen dramatisch. Es ist nun hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, konnte aber auch noch im Zytoplasma identifiziert werden. (C) Eine Überlagerung der Abbildungen B + E zeigt, dass die Interaktion beider Proteine (gelb) vorwiegend im Zellkern aber auch im Zytoplasma gefunden wurde. F zeigt die DAPI Färbung der Kern-DNA der in B, C und F gezeigten Zellen.

Das TRPS1-GFP Protein konnte in *TRPS1-GFP* transfizierten Zellen nur im Nukleus nachgewiesen werden und ist dort homogen verteilt (Abb. 3.9A). Zellen die nur mit dem *LC8a-Flag* Konstrukt transfiziert wurden zeigten, dass sich die Verbreitung des LC8a-Flag Proteins fast ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkt (Abb. 3.9D). In *TRPS1-GFP+LC8a-Flag* co-transfizierten Zellen konnte das TRPS1-GFP Protein noch immer hauptsächlich im Kern nachgewiesen werden, allerdings war es jetzt auch im Zytoplasma in einer Art Gradient um den Zellkern detektierbar (Abb. 3.9B). Interessanterweise zeigte das LC8a-Flag Protein eine völlig andere intrazelluläre Verteilung im Vergleich zu nicht mit *TRPS1-GFP* co-transfizierten Zellen. Es war hier vorherrschend im Kern, konnte aber auch noch im Zytoplasma nachgewiesen werden

(Abb. 3.9E). Eine Überlagerung der TRPS1-GFP und LC8a-Flag Signale zeigte, dass eine Co-Lokalisierung beider Fusionsproteine zwar hauptsächlich im Kern aber auch um den Zellkern herum im Zytoplasma zu finden war (Abb. 3.9C).

In weiteren Analysen sollte die intrazelluläre Verteilung der endogenen Proteine untersucht werden. Da sich TRPS1 und LC8a in humanen Fibroblasten nicht nur nachweisen sondern auch erfolgreich co-präzipitieren ließen, erfolgten die (Co-) Lokalisierungsstudien in diesem Zelltyp.

Circa 30.000 bis 50.000 Zellen wurden auf einem Deckgläschen kultiviert, mit Methanol fixiert und mit dem α TRPS1 Antiserum (Kaninchen) und einem aufgereinigten, anti-Kaninchen, Alexa-farbmarkierten Zweit-Antikörper (grün) (Molecular Probes) inkubiert. Die Markierung des LC8a Proteins erfolgte durch Verwendung des Alexis α LC8a Antikörpers (Ratte) und eines aufgereinigten, Cy3-markierten (rot), anti-Ratte Antikörpers.

Das TRPS1 Protein zeigte sich erwartungsgemäß hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Die Verteilung innerhalb des Zellkerns war hierbei allerdings nicht homogen und somit nicht wie in Experimenten mit dem transfizierten *TRPS1-GFP* Konstrukt, sondern war auf rundliche Strukturen im Zellkern beschränkt (Abb. 3.10A+D). Es wurden insgesamt mehr als 300 Zellen analysiert, wobei jede der untersuchten Zellen eine bis sechs derartige rundliche Strukturen aufwies. Des Weiteren konnte ein geringer Anteil von TRPS1 auch im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 3.10A+D). Im Gegensatz zu den ermittelten Daten unter transfizierten Bedingungen zeigte sich kein Konzentrationsgradient um den Zellkern, sondern eine unregelmäßige Verteilung im gesamten Zytoplasma.

LC8a konnte in jeder der über 300 analysierten Zellen als homogen im gesamten Zytoplasma verteiltes Protein detektiert werden (Abb. 3.10B+E). Interessanterweise zeigten ca. 60 % der Zellen LC8a zusätzlich als kernständiges Protein. Die Verteilung des LC8a Proteins innerhalb der Kerne war hierbei nicht homogen, sondern zeigte einzelne Bereiche erhöhter Konzentration wie sie auch für das TRPS1 Protein gezeigt wurden.

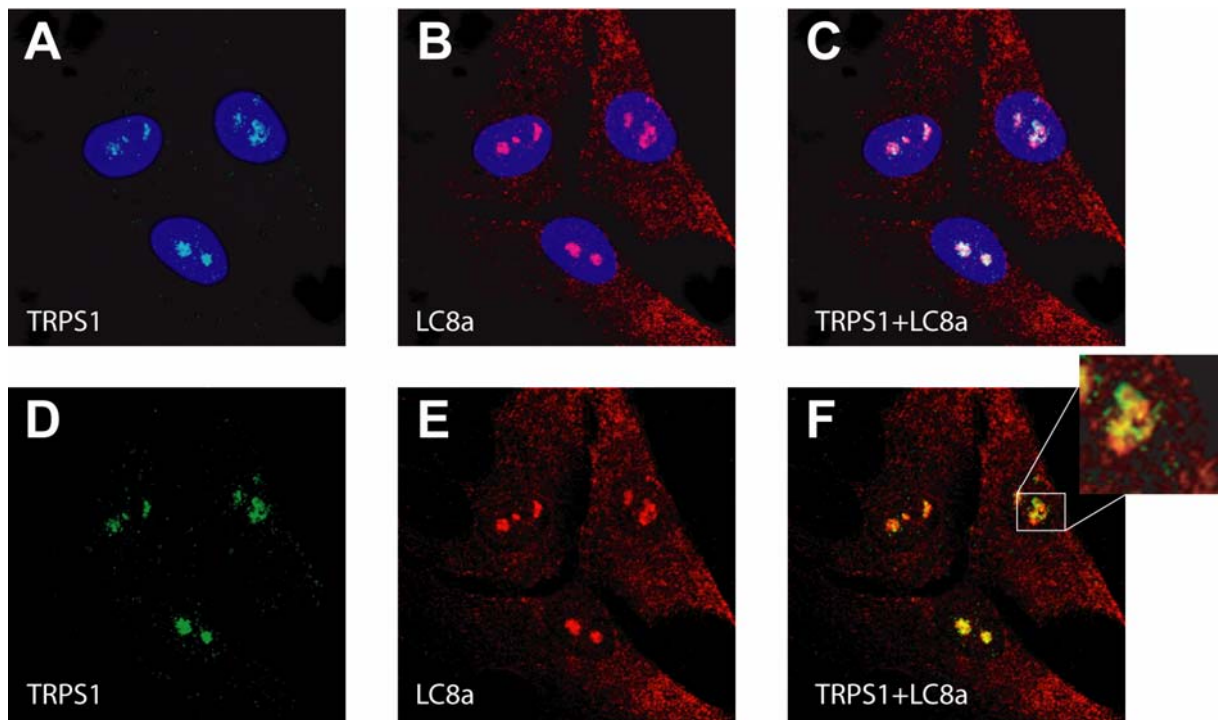


Abbildung 3.10 Intrazelluläre Co-Lokalisierung von TRPS1 und LC8a in humanen Fibroblasten

Die intrazelluläre Verteilung von TRPS1 und LC8a wurde in primären humanen Fibroblasten untersucht. TRPS1 wurde durch ein Kaninchen anti-TRPS1 Antiserum und einen aufgereinigten, Alexa-gekoppelten, anti-Kaninchen Antikörper grün markiert. Die rote Färbung von LC8a erfolgte durch die Verwendung eines Ratte anti-LC8a und eines aufgereinigten, anti-Ratte und Cy3-markierten Zweit-Antikörpers. Die Zellkerne wurden durch DAPI blau angefärbt (A, B+C). TRPS1 konnte hauptsächlich im Zellkern nachgewiesen werden. Es liegt dort nicht homogen verteilt vor, sondern konzentriert sich in rundlichen Bereichen (A+D). Auch innerhalb des Zytoplasmas konnte TRPS1 gezeigt werden. Es liegt hier diffus verteilt vor, wobei die Gesamtkonzentration an zytoplasmatischem TRPS1 von Zelle zu Zelle variierte. LC8a zeigte sich in allen analysierten Zellen als homogen im Zytoplasma verteiltes Protein. Zusätzlich konnte LC8a auch im Zellkern identifiziert werden (B+E). Die Verteilung innerhalb des Kerns ist hierbei nicht diffus, sondern ähnlich strukturiert wie die des TRPS1 Proteins. Eine Überlagerung der Signale (A+B bzw. D+E) zeigte, dass die Interaktion der beiden Proteine in den rundlichen Strukturen im Zellkern erfolgt (gelb) (C+F). Eine Interaktion im Zytoplasma konnte nicht gefunden werden.

Eine Überlagerung der TRPS1- und des LC8a-Signale ergab, dass es in diesen Arealen erhöhter Protein-Konzentration innerhalb des Zellkerns zur Co-Lokalisierung (gelb) kommt. Im Zytoplasma konnte dagegen keine Überlagerung der TRPS1- und LC8a-Signale beobachtet werden (Abb. 3.10C+F).

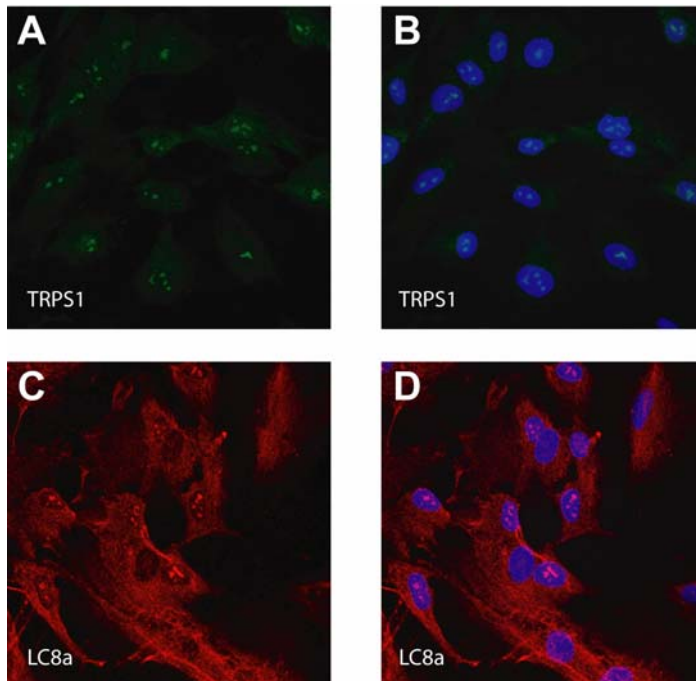


Abb. 3.11 Verteilung des intranukleären TRPS1 und LC8a in humanen Fibroblasten

Die Analyse von mehr als 1000 einzelner TRPS1 bzw. LC8a Immunfluoreszenz markierter Fibroblasten zeigte, dass TRPS1 in allen untersuchten Zellen eine bis sechs rundliche Strukturen erhöhter Protein-Konzentration innerhalb der Zellkerne bildet (A+B). Das LC8a Protein konnte neben seiner zytoplasmatischen Lokalisierung auch in ca. 60 % der betrachteten Zellen im Zellkern gefunden werden. Wenn LC8a im Nukleus detektierbar war bildete es rundliche Strukturen erhöhter Konzentration, wie sie auch bei TRPS1 gezeigt werden konnten.

3.3.1.3 LC8a reduziert die Bindung von TRPS1 an die GATA-Konsensus-Sequenz

Während der experimentellen Phase meiner Doktorarbeit zeigten zwei andere Arbeitsgruppen die Bindung von TRPS1 an die GATA-Konsensus-Sequenz. Studien mit mutierten bzw. verkürzten TRPS1 Proteinen zeigten, dass diese Wechselwirkung über den GATA-Zinkfinger (Zf 7) des TRPS1 Proteins erfolgt (Malik *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2002).

Durch die Anwendung der EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Technologie sollte ein eventueller Einfluss des LC8a Proteins auf die Bindung von TRPS1 zur DNA untersucht werden. Hierzu wurden die für TRPS1 und LC8a kodierenden cDNAs in den Vektor pcDNA4.0 integriert und unter Verwendung eines TNT-Retikulozyten-Lysates (Promega) die entsprechenden Proteine *in vitro* synthetisiert.

TRPS1 wurde mit unterschiedlichen Mengen LC8a prä-inkubiert und die Protein-Gemische anschließend mit ^{32}P radioaktiv markierten Oligonukleotiden, welche die GATA-Konsensus-Sequenz enthielten, inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine ansteigende LC8a Konzentration zur einer Verringerung der Anzahl gebildeter TRPS1-DNA Komplexe führte (Abb. 3.12, Spuren 4-7), vergleichend zur Quantität der Komplexe ohne LC8a Zugabe (Spuren 2+8). Durch Zugabe eines αTRPS1 Antiserums und einen dadurch induzierten Mobilitätsshift, konnte die Spezifität der gebildeten

TRPS1-DNA Komplexe gezeigt werden (Spur 3). Die Auswertung der Ergebnisse ergab somit, dass die Bindung von TRPS1 zur GATA-Konsensus-Sequenz durch LC8a konzentrationsabhängig reduziert wurde.

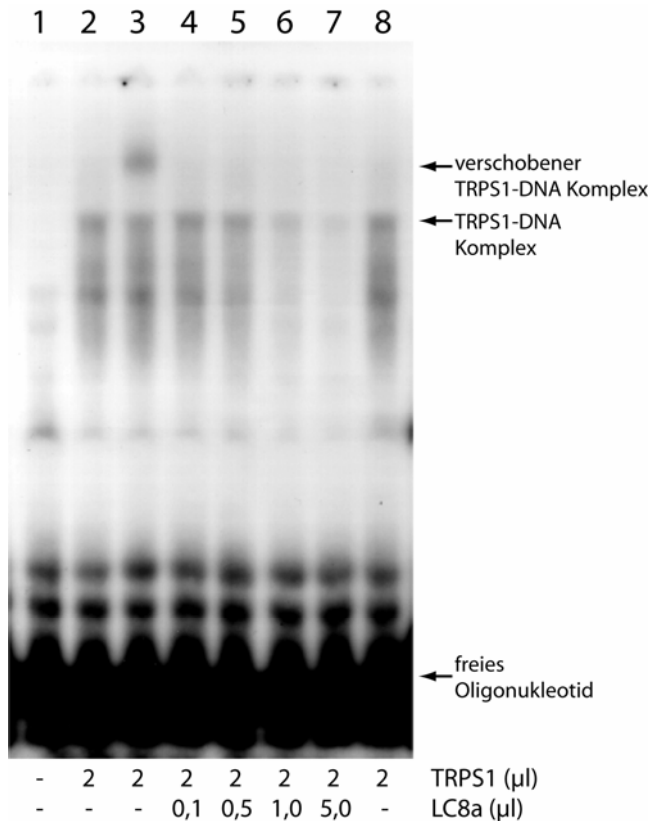


Abb. 3.12 LC8a reduziert die Bindung von TRPS1 an die GATA-Konsensus-Sequenz.

Zur Untersuchung des Einflusses von LC8a auf die Bindung von TRPS1 an die GATA-Konsensus-Sequenz wurde die EMSA Technologie angewandt. Die Zugabe ansteigender Mengen von LC8a reduzierte die Bildung von TRPS1-DNA Komplexen (Spuren 4-7) im Vergleich zur Menge gebildeter Komplexe ohne Zugabe von LC8a (Spuren 2 und 8). Spur 1 zeigt das Lysat/Oligonukleotid-Gemisch ohne Zugabe von TRPS1. Die Anwendung eines TRPS1 Antiserums (SN652) führte zu einem Mobilitätsshift des TRPS-DNA Komplexes und zeigte somit die Anwesenheit von TRPS1 in diesem Protein-DNA Komplex (Spur 3). Die jeweiligen Positionen der TRPS1-DNA Komplexe und der freien Oligonukleotide sind durch Pfeile markiert.

3.3.1.4 Die reprimierende Funktion von TRPS1 wird durch die Interaktion mit LC8a reduziert

Im Jahre 2001 konnte in einem Luciferase-Reporter Experiment gezeigt werden, dass TRPS1 die GATA-abhängige Aktivierung reprimiert (Malik *et al.*, 2001). Dieser Reporter Assay wurde hier verwendet um festzustellen, ob LC8a einen Einfluss auf die reprimierende Funktion von TRPS1 hat. Hierzu wurden HepG2 mit den Plasmiden XGATA4, TRPS1 und LC8a transfiziert. Als Reporter wurde das α D3 Konstrukt verwendet, welches das *Luciferase* Gen unter der Kontrolle multipler AGATAA Elemente enthält (Stoichet *et al.*, 2000). Die Luciferase-Aktivität von Zellen die nur mit α D3 transfiziert waren wurde als Referenzwert (100 % = 1) definiert (Abb. 3.13, Säule 1). Zellen welche mit XGATA4 und dem Reporter transfiziert wurden zeigten eine

erhöhte Aktivität von 5,7 (Säule 2), die durch die Zugabe einer äquivalenten Menge TRPS1 (w/w) drastisch reduziert wurde (1,4; Säule 3). Diese TRPS1-induzierte Repression konnte durch die Zugabe von LC8a abgeschwächt werden. Es wurden unterschiedliche Mengen LC8a verwendet um zu überprüfen, ob die Stärke dieses Effekts mit dem Verhältnis von LC8a zu TRPS1 korreliert. Die Verwendung gleicher Mengen TRPS1 und LC8a bewirkte eine starke Verringerung der TRPS1-induzierten Repression (Säule 4). Das Einsetzen einer geringeren Menge von LC8a (0,6/1) führte zu einer Reduktion dieses Effekts (Säule 5). Kontroll-Transfektionen zeigten, dass LC8a weder alleine (Säule 7) noch in Kombination mit XGATA4 (Säule 6) eine nachweisbare trans-aktivierende oder reprimierende Funktion hatte.

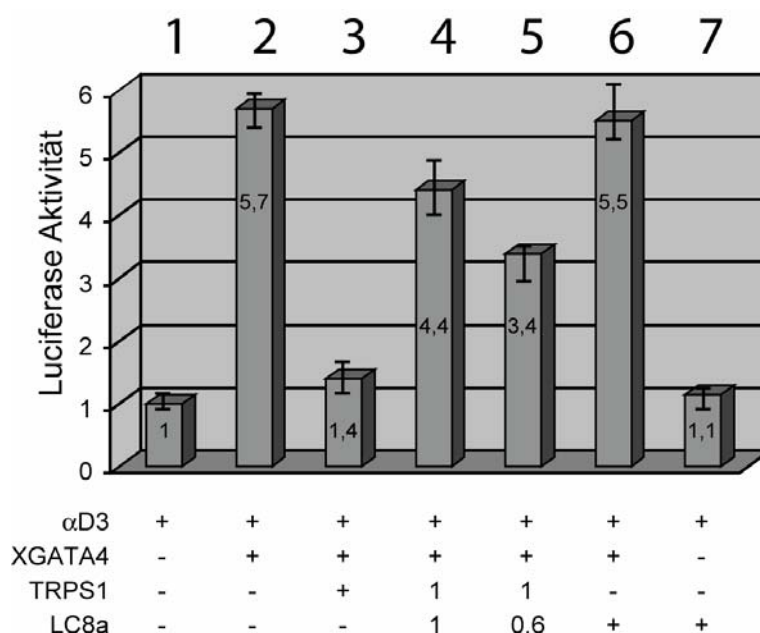


Abb. 3.13 Die reprimierende Funktion von TRPS1 wird durch LC8a reduziert

HepG2 wurden mit dem GATA-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmid α D3 transfiziert und die ermittelte Aktivität als Referenzwert definiert (Säule 1). Die Aktivität wurde durch Co-Transfektion mit dem XGATA4-Konstrukt auf 5,7 (Säule 2) erhöht und konnte durch die Zugabe einer äquivalenten Menge TRPS1 (w/w) auf 1,4 reduziert werden (Säule 3). Diese TRPS1 induzierte Repression wurde durch ansteigende Mengen LC8a konzentrationsabhängig reduziert (Säulen 4+5). Eine transkriptionelle Funktion von LC8a, alleine (Säule 7) oder in Anwesenheit von XGATA4 (Säule 6), konnte nicht gefunden werden.

3.3.2 Die Interaktion von TRPS1 und RNF4

3.3.2.1 Expression und Co-Immunpräzipitierung von TRPS1 und RNF4

In den folgenden Experimenten wurde die Interaktion zwischen TRPS1 und RNF4 untersucht. Dazu wurden COS-1 Zellen mittels Elektroporation mit den Konstrukten *TRPS1-GFP* und *RNF4-Flag* oder einem der Konstrukte und dem entsprechenden leeren Vektor co-transfiziert. Die Expression des jeweiligen Fusionskonstruktes wurde durch Western-Blot Analyse unter Verwendung des α TRPS1 Antiserums (Abb. 3.14A) bzw. des α Flag Antikörpers (Abb. 3.14B) überprüft und konnte nur in den entsprechend transfizierten Zellen gezeigt werden. Um die Interaktion der beiden Fusionsproteine nachzuweisen erfolgten eine Inkubation der Zellextrakte mit der M2- α Flag-Sepharose und die Analysen der an die Sepharose gekoppelten Proteine mittels Western-Blot. Nur in *TRPS1-GFP+RNF4-Flag* co-transfizierten Zellen konnte ein TRPS1-Signal nachgewiesen werden (Abb. 3.14C, Spur 1). Die Kontroll-Experimente *TRPS1-GFP+pFlag* (Spur 2) und *pGFP+pFlag* (Spur 3) zeigten kein co-präzipitiertes TRPS1-GFP Protein, wodurch unspezifische Interaktionen der Fusionsproteine zu einer der verwendeten Komponenten ausgeschlossen werden konnten.

Da es sich hierbei um transfizierte Zellen handelt, lagen beide Genprodukte überexprimiert und somit in einem nicht physiologischen Zustand vor. Um die Interaktion unter physiologischen Bedingungen nachzuweisen musste eine Zelllinie gefunden werden, die beide Gene in detektierbarem Maße exprimiert. Da sich, wie bereits beschrieben, die Interaktion von TRPS1 und LC8a in primären humanen Fibroblasten zeigen ließ (siehe 3.3.1.1), wurden Fibroblasten-Extrakte auf die Expression von *RNF4* untersucht. Durch Western-Blot Analysen und die Verwendung eines Kaninchen α RNF4 Antiserums (Geschenk von J. Palvimo, siehe Moilanen *et al.*, 1998) konnte das RNF4-Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.14E, Spur1).

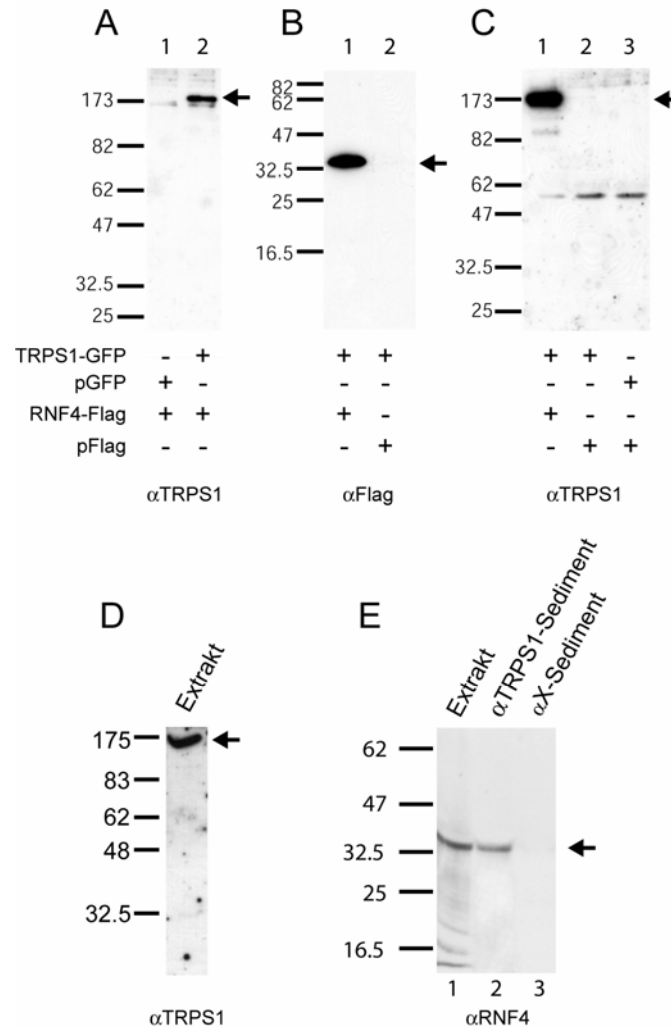


Abb. 3.14 Expression und Co-Präzipitierung von TRPS1 und RNF4

COS-1 Zellen wurden mit den Konstrukten *TRPS1-GFP* und *RNF4-Flag* oder entsprechenden Leer-Plasmiden co-transfiziert. (A) Das TRPS1-GFP Fusionsprotein konnte mit Hilfe eines α TRPS1 Antiserums nur in Extrakten *TRPS1-GFP+RNF4-Flag* co-transfizierter Zellen nachgewiesen werden (Spur 2). Kontroll-Experimente mit leerem GFP Plasmid ergaben kein entsprechendes Signal (Spur 1). (B) RNF4-Flag wurde durch einen kommerziellen α Flag Antikörper in *TRPS1-GFP+RNF4-Flag* co-transfizierten Zellen gezeigt (Spur 1), wobei Kontroll-Experimente kein Signal zeigten (Spur 2). Um eine Interaktion beider Proteine zu zeigen wurden Zellextrakte mit einer M2- α Flag-Matrix inkubiert und die Präzipitate mit dem α TRPS1 Antiserum analysiert (C). Das TRPS1-GFP Fusionsprotein konnte nur in Extrakten *TRPS1-GFP+RNF4-Flag* co-transfizierter Zellen nachgewiesen werden (Spur 1), Kontrollen mit leerem Flag Plasmid zeigten kein TRPS1-GFP (Spuren 2+3).

Die Expression von *RNF4* und *TRPS1* konnte in Extrakten primärer humaner Fibroblasten gezeigt werden (D+E). TRPS1 wurde mit einem α TRPS1 Antiserum (D) und RNF4 mit einem α RNF4 Antiserum (E, Spur 1) nachgewiesen. Durch die Verwendung eines monoklonalen Maus α TRPS1 Antikörpers wurde das TRPS1 Protein präzipitiert und das Sediment mit einem α RNF4 Antiserum analysiert (E, Spur 2). Die Verwendung eines irrelevanten Antikörpers (α X) zur Immunpräzipitierung zeigte kein sedimentiertes RNF4 (E, Spur 3).

Die Untersuchung der Interaktion beider Proteine erfolgte durch eine Inkubation der Extrakte mit einem monoklonalen Maus α TRPS1 Antikörper (Geschenk von G.T. Chang). Die Präzipitate wurden mehrfach gewaschen und anschließend mittels Western-

Blot analysiert. Durch die Verwendung des α RNF4 Antiserums konnte ein deutliches RNF4-Signal und somit die Interaktion zwischen TRPS1 und RNF4 identifiziert werden (Abb. 3.14E, Spur 2). Die Verwendung eines irrelevanten Antikörpers zur Sedimentation konnte kein RNF4 co-präzipitieren (Abb. 3.14E, Spur 3).

3.3.2.2 Intrazelluläre Lokalisierung von TRPS1 und RNF4

Nachdem die TRPS1-RNF4 Interaktion nachgewiesen werden konnte sollte durch Immunfluoreszenz-Markierungen die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine aufgeklärt werden. Dazu wurden NIH-3T3 Zellen einzeln oder gemeinsam mit den Konstrukten *TRPS1-GFP* und *RNF4-Flag* transfiziert bzw. co-transfiziert. Die Auswertung erfolgte mittels CLSM.

In *RNF4-Flag* transfizierten Zellen zeigte sich das RNF4-Flag Fusionsprotein, ähnlich wie das bereits vorher beschriebene TRPS1-GFP Fusionsprotein (Abb. 3.15A, siehe auch 3.3A und 3.9A), als ubiquitär im Zellkern verbreitet (Abb. 3.15B). In mehr als 100 analysierten Zellen konnte kein zytoplasmatisches RNF4-Flag Signal identifiziert werden. Die intrazelluläre Verteilung der beiden Fusionsproteine unterschied sich nicht von der *TRPS1-GFP+RNF4-FLAG* co-transfizierter Zellen. Eine Überlagerung beider Signale zeigte, dass es innerhalb des Zellkerns zu Co-Lokalisierungen (gelb) beider Proteine kam (Abb. 3.15C+D).

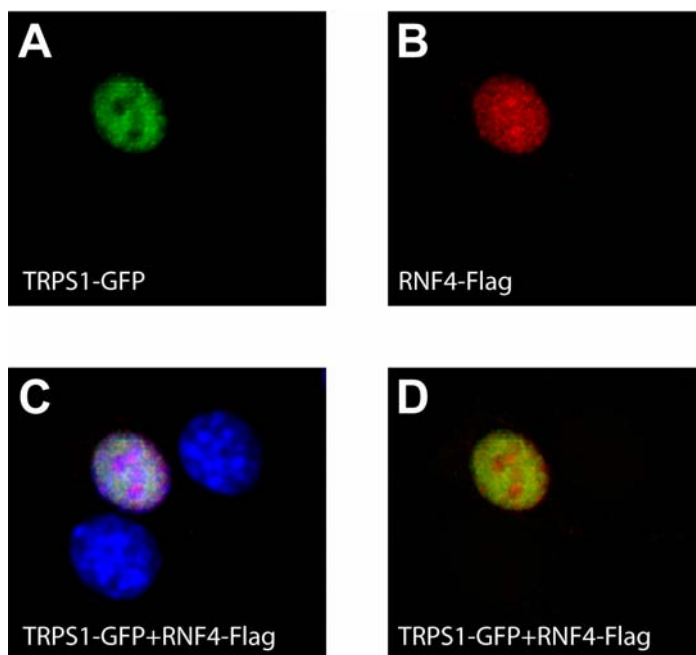


Abb. 3.15 Intrazelluläre Verteilung von TRPS1 und RNF4 in transfizierten NIH-3T3 Zellen

NIH-3T3 Zellen wurden mit einem *TRPS1-GFP* und *RNF4-Flag* Konstrukt co-transfiziert. Das TRPS1-GFP Genprodukt fluoresziert grün und das RNF4-Flag Protein wurde durch die Verwendung eines Maus α Flag und eines Rhodamin-gekoppelten anti-Maus Antikörpers rot markiert. Die DNA der Nuklei wurden durch DAPI blau angefärbt (C). Sowohl das TRPS1-GFP (A) als auch das RNF4-Flag (B) konnten ausschließlich als homogen im Zellkern verteilte Proteine nachgewiesen werden. Die Überlagerung beider Signale zeigte, dass es im gesamten Zellkern zur Co-Lokalisierung (gelb) kommt (C+D).

Da die subzelluläre Verteilung des endogenen RNF4 Proteins in der Literatur sowohl als nukleär als auch als zytoplasmatisch beschrieben ist (Moilanen *et al.*, 1998; Galili *et al.*, 2000), wurde die Lokalisierung des endogenen RNF4 in humanen Fibroblasten untersucht. Zur Visualisierung des RNF4 Proteins wurde das Kaninchen α RNF4 Antiserum und ein Alexa-markierter (grün), anti-Kaninchen Zweit-Antikörper (Molecular Probes) verwendet. Es zeigte sich das RNF4 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektierbar war. Die Verteilung innerhalb des Zytoplasmas war hierbei homogen, wobei RNF4 im Zellkern einzelne rundliche Strukturen erhöhter Konzentration bildete (Abb. 3.16). Diese Strukturen waren wesentlich zahlreicher und kleiner als die vom TRPS1 Protein gebildeten Strukturen innerhalb des Zellkerns (siehe Abb. 3.10A+D, 3.11A+B). Co-Lokalisierungs-Experimente zur Untersuchungen des endogenen TRPS1 und RNF4 konnten zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da beide für diese Experimente verwendbaren Antiseren in Kaninchen generiert wurden und somit keine spezifische Farbmarkierung durch einen Zweit-Antikörper möglich war.

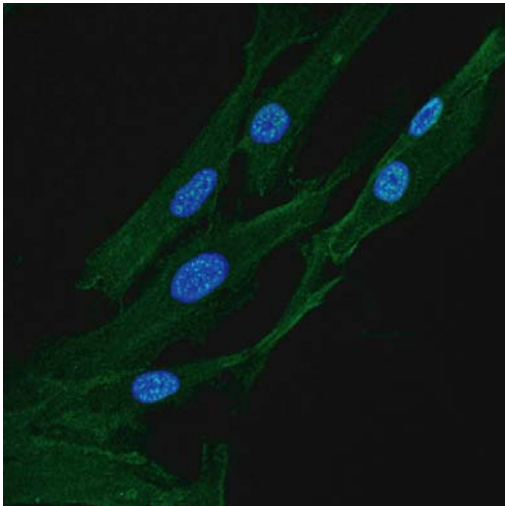


Abb. 3.16 Intrazelluläre Lokalisation des endogenen RNF4 Proteins in humanen Fibroblasten

Die intrazelluläre Verteilung des RNF4 Proteins wurde durch die Verwendung eines Kaninchen α RNF4 Antiserums und eines anti-Kaninchen, Alexa-markierten (grün) Zweit-Antikörpers mittels CLSM analysiert. RNF4 konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern humaner Fibroblasten identifiziert werden. Innerhalb des Zytoplasmas ist es homogen verteilt, wobei es im Zellkern zu zahlreichen kreisförmigen Akkumulationen erhöhter Konzentration kommt.

3.3.2.3 RNF4 reduziert die Bildung von TRPS1-DNA Komplexen

Da die TRPS1-LC8a Interaktion die Bildung von TRPS1-DNA Komplexen reduziert (siehe 3.3.1.3) sollte auch der Einfluss von RNF4 auf TRPS1-DNA Interaktion untersucht werden. Hierzu wurden TRPS1, RNF4 und das Trps1 Fragment F10 *in vitro* synthetisiert. Das Trps1 Fragment F10 diente dabei als irrelevantes Kontroll-Protein, da es weder Interaktion zur GATA-Sequenz noch zum RNF4-Protein zeigt. TRPS1 alleine oder nach Prä-Inkubation mit RNF4 bzw. dem Fragment F10 wurde mit radioaktiv markierten GATA-Oligonukleotiden inkubiert und die Gemische auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (siehe 2.10.4).

RNF4 führte zu einer deutlichen Reduzierung der Quantität gebildeter TRPS1-DNA Komplexe (Abb. 3.17, Spur 3). Das Fragment F10 zeigte keinen Einfluss auf die Menge gebildeter TRPS1-DNA Komplexe (Abb. 3.17, Spur 4), im Vergleich zur TRPS1-Kontrolle (Spur 2). Die Spezifität der gebildeten TRPS1-DNA Komplexe konnte bereits vorher durch die Verwendung eines α TRPS1 Antiserums und einen daraus resultierenden Mobilitätsshift gezeigt werden (siehe 3.3.1.3 Abb. 3.12).

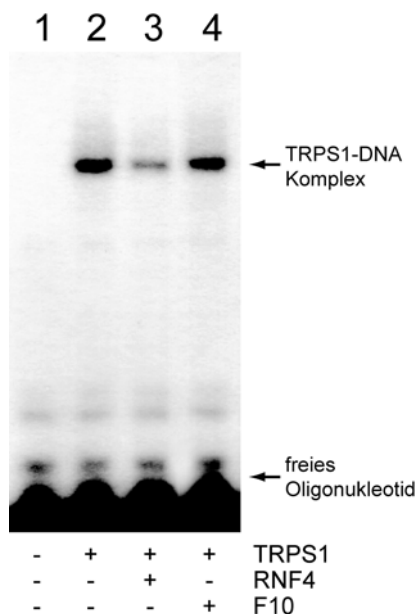


Abb. 3.17 RNF4 verringert die Bildung von TRPS1-DNA Komplexen

Um den Einfluss von RNF4 auf die Bindung von TRPS1 an die GATA-Konsensus-Sequenz zu untersuchen wurde *in vitro* synthetisiertes TRPS1 alleine, mit RNF4 oder einem hier nicht funktionellen Trps1 Fragment (F10) prä-inkubiert, mit radioaktiv markierten GATA-Oligonukleotiden inkubiert und die Gemische mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle wurde nicht behandeltes Lysat verwendet (Spur 1). Die Verwendung von TRPS1 führt zur Bildung von TRPS1-DNA Komplexen (Spur 2). Durch Zugabe von RNF wurde die Anzahl der gebildeten TRPS1-DNA Komplexen deutlich reduziert (Spur 3). Die Verwendung eines nicht relevanten Proteins, hier F10, welches weder eine Interaktion zu RNF4 noch zum verwendeten GATA-Oligonukleotid zeigt, führte nicht zur Verringerung der Menge gebildeter TRPS1-DNA Komplexe. Freie GATA-Oligonukleotide und die TRPS1-DNA Komplexe sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet.

3.3.2.4 RNF4 inhibiert die reprimierende Funktion von TRPS1 in der GATA-regulierten Transkription

Wie bereits erwähnt konnte gezeigt werden, dass TRPS1 eine reprimierende Funktion auf die GATA-induzierte Transkription hat (Malik *et al.*, 2001). Diese Repression konnte durch die Interaktion von TRPS1 zu LC8a reduziert werden (siehe 3.3.1.4). In weiteren Luciferase-Reporter Experimenten sollte der Einfluss von RNF4 auf die transkriptionelle Funktion des Transkriptionsfaktors TRPS1 untersucht werden. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit dem Reporter-Plasmid α D3 transfiziert und die ermittelte Luciferase-Aktivität als Referenzwert definiert (Abb. 3.18, Säule 1). Durch die Transfektion mit XGATA4 (0,5 μ g) konnte die Aktivität deutlich erhöht (Säule 2) und durch Zugabe der halben Menge (w/w) von TRPS1 (0,25 μ g) wieder reduziert werden (Säule 3). Diese reprimierende Wirkung des TRPS1 Proteins wurde durch die Zugabe von RNF4 inhibiert (Säulen 5+7). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich RNF4 aktivierend auf die GATA-regulierte Transkription auswirkt (Säulen 4+6), wobei RNF4 alleine keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription des Reporters hatte (Säule 8).

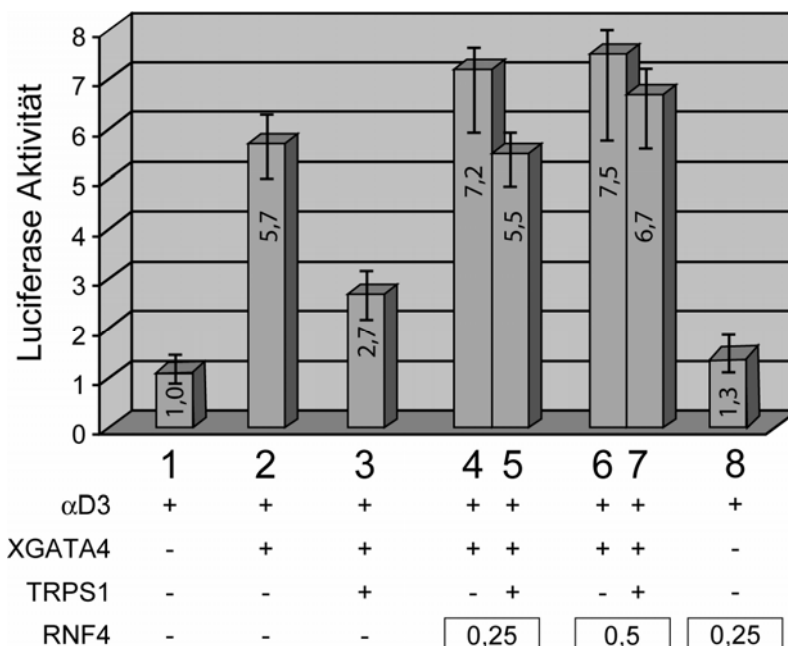


Abb. 3.18 RNF4 inhibiert die reprimierende Funktion von TRPS1

COS-7 Zellen wurden mit dem Luciferase-Reporter α D3 transfiziert und die ermittelte Luciferase-Aktivität als Referenzwert definiert (Säule 1). Durch Hinzufügen des XGATA4 (0,5 μ g) Transkriptionsfaktors kam es zu einem starken Anstieg der Aktivität (Säule 2), der durch TRPS1 (0,25 μ g) deutlich reduziert wurde (Säule 3). Diese durch TRPS1 induzierte Repression konnte durch die Zugabe von RNF4 inhibiert (Säulen 5+7) werden. In Kontroll-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich RNF4 aktivierend auf die GATA induzierte Transkription auswirkt (Säulen 4+6), wobei RNF4 alleine keine aktivierende Funktion zeigte (Säule 8).

3.3.3 Die Interaktion von TRPS1 und TOPORS

3.3.3.1 Expression und Co-Immunpräzipitierung von TRPS1 und TOPORS

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Experimente beschreiben die Analysen zur Interaktion zwischen TRPS1 und TOPORS. Zu diesem Zweck wurden COS-7 Zellen mit den Konstrukten *TRPS1-Flag* und *GFP-TOPORS* gemeinsam oder einzeln mit dem entsprechenden Leer-Plasmid co-transfiziert.

Extrakte entsprechend transfizierter Zellen wurden auf die Expression der jeweiligen Fusionskonstrukte hin untersucht. Durch die Verwendung eines α Flag bzw. eines α GFP Antikörpers (Santa Cruz) konnten beide Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Die Spezifität der detektierten Banden wurde durch den Einsatz eines α TRPS1- bzw. eines α TOPORS-Antiserums (Geschenk von E. Rubin) verifiziert. Um die Interaktion beider Fusionsproteine zu untersuchen wurden Zellextrakte co-transfizierter Zellen mit der M2- α Flag-Sepharose inkubiert, gewaschen und mittels Western-Blot analysiert. Ein Teil der sedimentierten Sepharose wurde durch die Verwendung des α Flag Antikörpers auf präzipitiertes TRPS1-Flag hin untersucht, wodurch die erfolgreiche Sedimentierung des TRPS1-Flag Proteins gezeigt wurde (Abb. 3.19B). In Analysen der verbleibenden Sepharose konnte das GFP-TOPORS Fusionsprotein mit dem α GFP-Antikörper bzw. dem α TOPORS-Antiserum nur in Zellextrakten *GFP-TOPORS+TRPS1-Flag* co-transfizierter Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.19C, Spur 1 und D). Kontroll-Experimente in denen nur eines der Fusionskonstrukte oder zwei Leer-Plasmide verwendet wurden zeigten kein Signal, wodurch unspezifische Interaktionen der Fusionsproteine mit den verwendeten Komponenten ausgeschlossen werden konnten (Abb. 3.19C, Spuren 2-4).

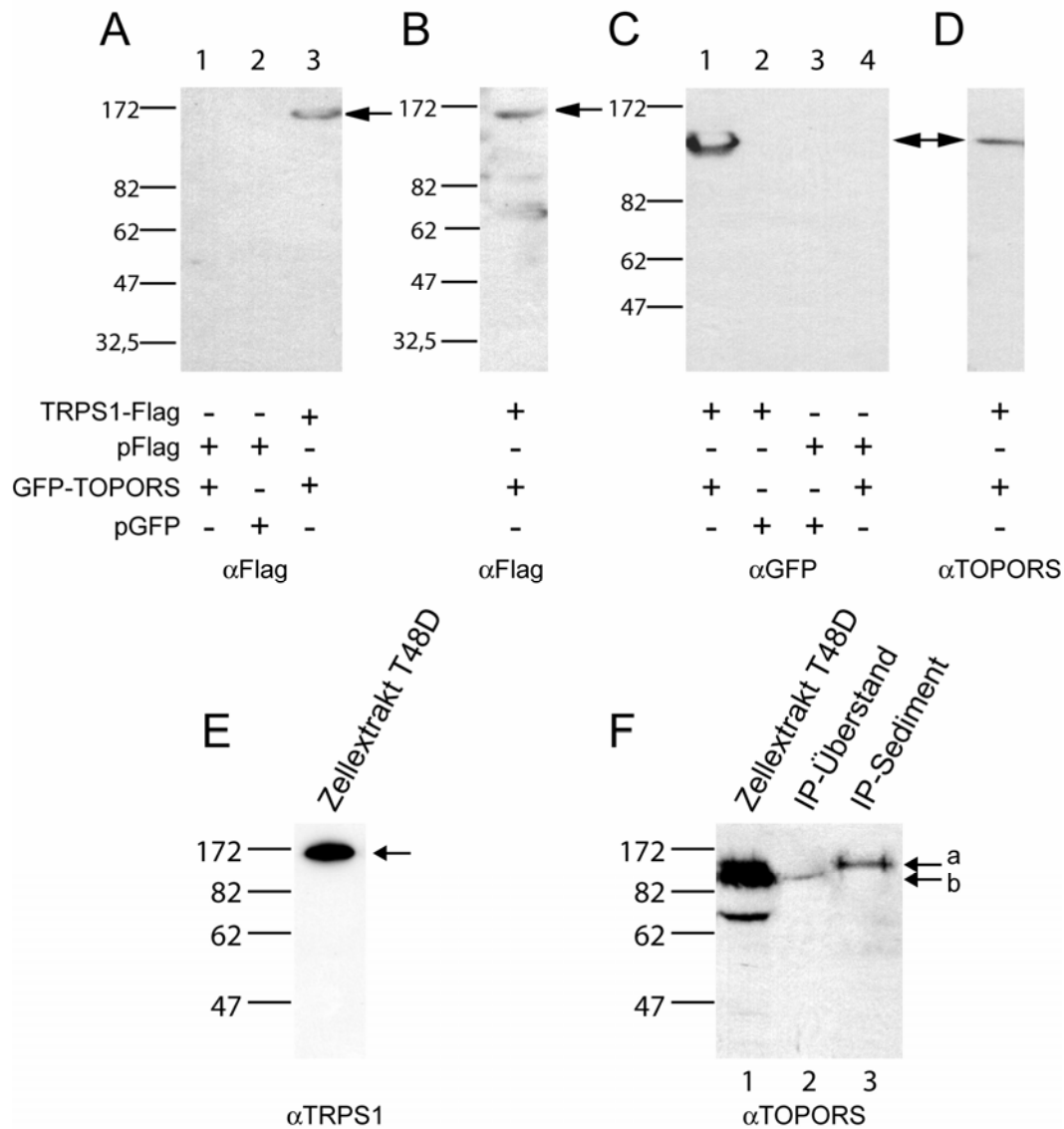


Abb. 3.19 Expression und Co-Präzipitierung von TRPS1 und TOPORS

COS-7 Zellen wurden mit den Konstrukten *TRPS1-Flag* und *GFP-TOPORS* oder entsprechenden Leer-Plasmiden co-transfiziert und die Expression der jeweiligen Konstrukte durch Western-Blot Analysen überprüft. Das TRPS1-Flag Fusionsprotein konnte durch einen αFlag Antikörper nur in Extrakten entsprechend transfizierter Zellen gezeigt werden (A, Spur 3). Kontroll-Experimente mit leerem Flag-Vektor zeigten kein TRPS1 Signal (A, Spuren 1+2). Zur Untersuchung der Interaktion der Fusionsproteine wurden Zellextrakte entsprechend co-transfizierter Zellen mit einer M2-αFlag-Sepharose inkubiert und die Präzipitate analysiert. Zur Kontrolle wurde die erfolgreiche Präzipitierung des TRPS1-Flag Proteins durch einen αFlag Antikörper überprüft (B). Das GFP-TOPORS Fusionsprotein konnte durch Verwendung des αGFP Antikörpers nur in den Präzipitaten *GFP-TOPORS+TRPS1-Flag* co-transfizierter Zellen identifiziert werden (C, Spur 1). Kontroll-Experimente mit nur einem Fusionskonstrukt (C, Spur 2+4) oder beiden Leer-Plasmiden (Spur 3) zeigten kein GFP-TOPORS-Signal. Die Spezifität des gezeigten GFP-TOPORS Signals konnte durch die Verwendung des αTOPORS Antiserums verifiziert werden (D). Das endogene TRPS1 konnte durch das αTRPS1 Antiserum in Extrakten nativer T48D Zellen nachgewiesen werden (E). Durch das αTOPORS Antiserum konnten in diesen Extrakten drei Signale identifiziert werden, wobei sich zwei im erwarteten Größenbereich von TOPORS befanden (F, Spur 1). Zur Analyse der TRPS1-TOPORS Interaktion wurden T48D Zellextrakte mit einem monoklonalen αTRPS1 Antikörper inkubiert und die Präzipitate mit dem αTOPORS Antiserum analysiert. Durch dieses Analyse konnte nur ein Signal in den Präzipitaten identifiziert werden (Pfeil a). Die Untersuchung des Präzipitat-Überstandes zeigte ebenfalls eine diskrete Bande (F, Spur 2, Pfeil b), die unterhalb der im Sediment identifizierten Bande migrierte.

Da sich das endogene TOPORS Protein nur sehr schwierig nachweisen lässt (persönliche Mitteilung von E. Rubin) wurde für Interaktionsstudien unter nativen Bedingungen eine spezielle Prostata Krebszelllinie (T48D, Geschenk von G.T. Chang) verwendet, die eine sehr starke *TRPS1* Expression zeigt (Abb. 3.20E). Durch die Verwendung des α TOPORS Antiserums konnten in Extrakten dieser Zellen drei Signale identifiziert werden, wobei zwei dieser Signale im kalkulierten molekularen Größen-Bereich von TOPORS (ca. 119 kDa) zu finden waren (Abb. 3.20F, Spur 1). Um die Interaktion zwischen TRPS1 und TOPORS nachzuweisen wurden T48D Zellextrakte mit einem monoklonalen α TRPS1 Antikörper inkubiert, die Antikörper-Protein Komplexe sedimentiert, mehrfach gewaschen und mittels Western-Blot analysiert. Durch die Verwendung des α TOPORS Antiserums konnte eine diskrete Bande im Bereich von ca. 130 kDa im Sediment detektiert werden (Abb. 3.20F, Spur 3, Pfeil a). Untersuchungen des Überstandes zeigten ebenfalls ein Signal, welches im Bereich von ca. 120 kDa migrierte (Abb. 3.20F, Spur 2, Pfeil b).

3.3.3.2 Intrazelluläre Lokalisation von TRPS1-Flag und GFP-TOPORS in transfizierten Zellen

Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von TRPS1 und TOPORS wurden COS-7, NIH-3T3 und HeLa Zellen mit *TRPS1-Flag* und *GFP-TOPORS* Fusionskonstrukten transfiziert und mittels CLSM analysiert. Zur Visualisierung des TRPS1-Flag Proteins wurden ein α Flag und ein Rhodamin-markierter (rot) Zweit-Antikörper verwendet.

Das so markierte TRPS1-Flag Protein konnte ausschließlich im Zellkern von *TRPS1-Flag* transfizierten Zellen gefunden werden. Wie in den bereits beschriebenen Experimenten war es innerhalb des Zellkerns homogen verteilt (Abb. 3.20). Kürzlich konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass TOPORS sowohl unter transfizierten als auch unter nativen Bedingungen innerhalb des Zellkerns in punktförmigen Strukturen vorliegt. Weitere Analysen zeigten, dass es sich bei diesen Strukturen um so genannte PML (promyelocytic leukemia)-Kernkörperchen handelt (Rasheed *et al.*, 2002).

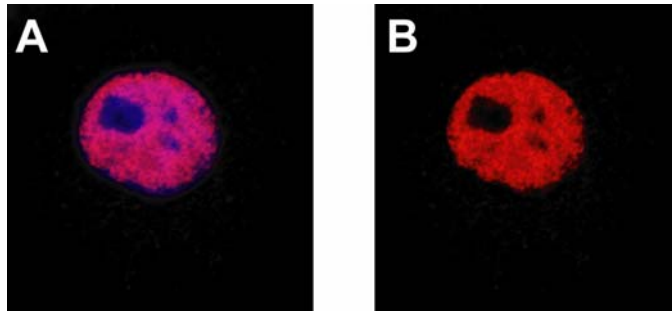


Abb. 3.20 Intrazelluläre Verteilung von TRPS1 in *TRPS1-Flag* transfizierten COS-7 Zellen

COS-7 Zellen wurden mit dem *TRPS1-Flag* Konstrukt transfiziert und die intrazelluläre Lokalisierung des TRPS1-Flag Fusionsproteins analysiert. Das Fusionsprotein zeigte eine homogene Verteilung im gesamten Zellkern. Teil A zeigt die Zelle mit und Teil B ohne DAPI Färbung.

Erwartungsgemäß zeigten Analysen von *TRPS1-Flag*+*GFP-TOPORS* co-transfizierter Zellen das GFP-TOPORS Fusionsprotein in punktförmigen Strukturen innerhalb des Zellkerns (Abb. 3.21A). Interessanterweise konnte das TRPS1-Flag Protein ebenfalls in punktförmigen Strukturen und nicht mehr als homogen im Zellkern verteiltes Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.21B). Eine Überlagerung der GFP-TOPORS und TRPS1-Flag Signale zeigte eine Co-Lokalisation innerhalb der PML-Kernkörperchen (Abb. 3.21C+D). Die Auswertung von mehr als 100 co-transfizierten Zellen ergab, dass die Anzahl gebildeter punktförmiger Strukturen des GFP-TOPORS Proteins größer war als die des TRPS1-Flag Proteins. Des Weiteren konnte das TRPS1-Flag Fusionsprotein nur in *GFP-TOPORS* co-transfizierten Zellen innerhalb dieser punktförmigen Strukturen nachgewiesen werden, wohingegen das GFP-TOPORS Protein auch ohne das TRPS1-Flag Protein in den PML-Kernkörperchen zu finden war.

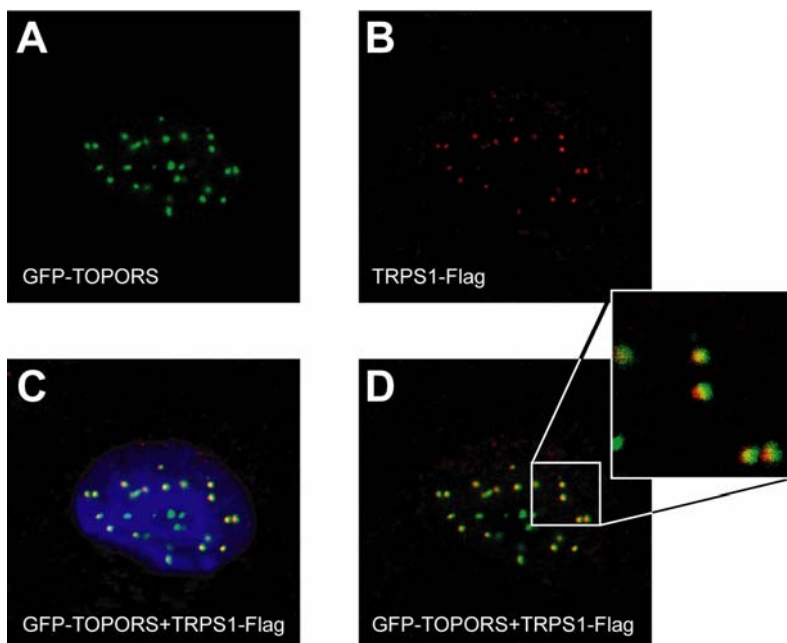


Abb. 3.21 Intrazelluläre Lokalisation von TRPS1 und TOPORS in co-transfizierten COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden mit den Konstrukten *GFP-TOPORS* und *TRPS1-Flag* co-transfiziert und die Lokalisation beider Fusionsproteine mittels CLSM analysiert. (A) GFP-TOPORS konnte innerhalb des Zellkerns in punktförmigen Strukturen, den PML-Kernkörperchen gezeigt werden. (B) Interessanterweise zeigte sich das TRPS1-Flag Protein unter diesen Bedingungen ebenfalls in punktförmigen Strukturen. (C+D) Eine Überlagerung beider Signale zeigte eine Co-Lokalisation beider Fusions-Proteine innerhalb dieser punktförmigen Strukturen. Abbildung C zeigt D mit einer zusätzlichen DAPI Markierung.

3.3.3.2.1 Untersuchung der intrazellulären Verteilung des endogenen PML und TRPS1 Proteins in nativen humanen Fibroblasten

Da die derzeit verfügbaren TRPS1- bzw. TOPORS-spezifischen Antiseren in Kaninchen generiert wurden, war es zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht möglich Co-Lokalisierungsstudien der endogenen Proteine TRPS1 und TOPORS durchzuführen. Durch Studien über die Verteilung des endogenen TOPORS Proteins innerhalb der Zelle war bekannt, dass TOPORS in den PML-Kernkörperchen vorliegt (Rasheed *et al.*, 2002). Um zu überprüfen ob das endogene TRPS1 ebenfalls in den PML-Kernkörperchen nachweisbar ist wurden TRPS1+PML Co-Lokalisierungsstudien durchgeführt. Hierzu wurden ca. 30.000 Fibroblastenzellen auf Deckgläschen kultiviert, mit Methanol fixiert und die entsprechenden Proteine mit den jeweiligen Antikörpern markiert. TRPS1 wurde durch das Kaninchen α TRPS1-Antiserum und durch einen aufgereinigten, anti-Kaninchen und Alexa-markierten (grün) Zweit-Antikörper markiert. Die Detektion des PML Proteins erfolgte über einen Maus α PML Antikörper (Santa Cruz) und einen aufgereinigten, anti-Maus und Cy3-markierten (rot) Zweit-Antikörper. Das PML-Protein konnte innerhalb der Zellkerne in punktförmigen Strukturen, den PML-Kernkörperchen, gezeigt werden (Abb. 3.22A). TRPS1 konnte neben den bereits gezeigten großen rundlichen Strukturen innerhalb des Zellkerns auch in einzelnen kleineren punktförmigen Strukturen identifiziert werden (Abb. 3.22B). Eine Überlagerung der TRPS1- und PML-Signale zeigte, dass es innerhalb der kleineren punktförmigen Strukturen zur Co-Lokalisierung (gelb) beider Proteine kommt (Abb. 3.23F). Somit konnte das endogene TRPS1 erstmals innerhalb der PML-Kernkörperchen gezeigt werden. Zusätzlich konnten einzelne PML-Signale auch innerhalb der von TRPS1 gebildeten größeren Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 3.22E).

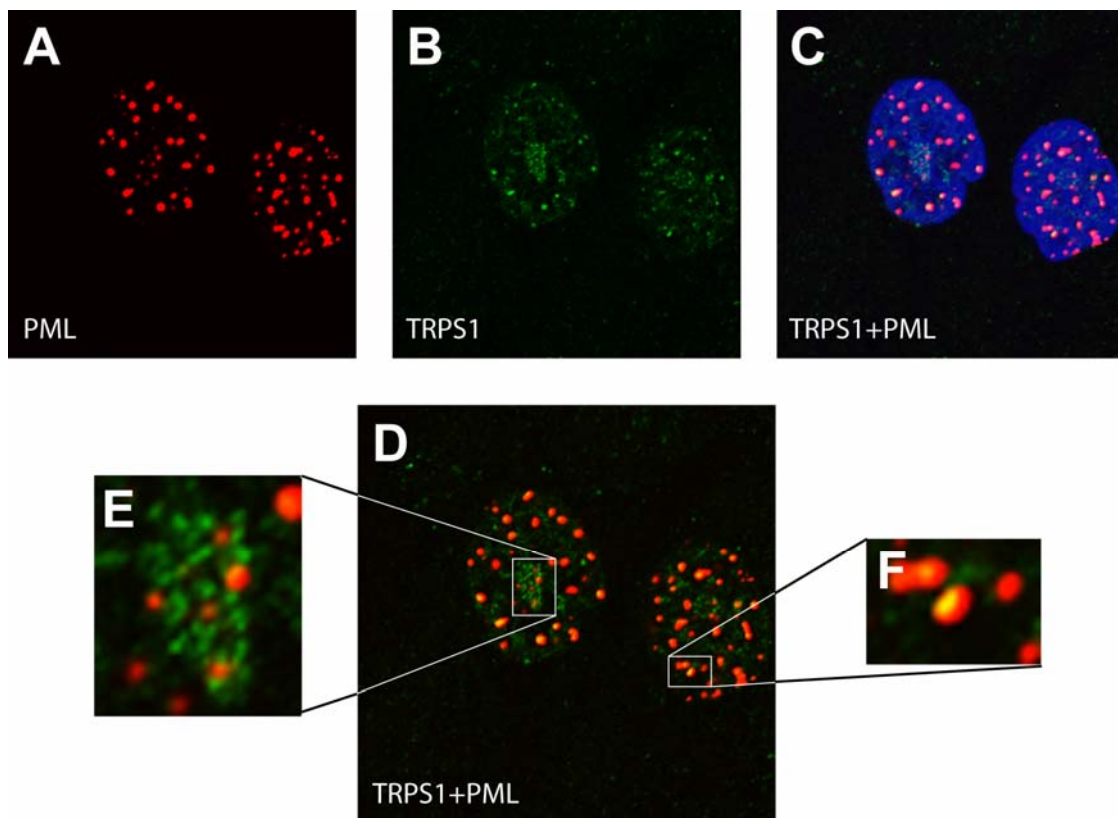


Abb. 3.22 Intrazelluläre Verteilung von TRPS1 und PML in primären humanen Fibroblasten

Die intrazelluläre Lokalisierung des TRPS1 und des PML Proteins wurde mittels CLSM in humanen Fibroblasten untersucht. Das TRPS1 Protein wurde durch ein α TRPS1 Antiserums und eines Alexa markierten (grün) Zweit-Antikörpers und PML durch einen α PML und einen Cy3 markierten (rot) Zweit-Antikörpers detektiert. (A) Das PML Protein zeigte sich in den typischen PML-Kernkörperchen. (B) TRPS1 konnte neben den bereits gezeigten Regionen erhöhter Konzentration auch in einzelnen kleinen punktförmigen Bereichen lokalisiert werden. C zeigt eine Überlagerung der Abbildungen A und B mit zusätzlicher DAPI Blau Markierung (D) Die Überlagerung der TRPS1- und PML-Signale zeigte, dass es innerhalb der kleinen kreisförmigen Strukturen zu einer TRPS1-PML Co-Lokalisierung kommt (F). (E) Interessanterweise konnte das PML Protein auch in den Regionen erhöhter TRPS1 Konzentration gezeigt werden.

3.3.3.3 TOPORS hat keinen signifikanten Einfluss auf die durch TRPS1 vermittelte Repression

In Luciferase Reporter Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl LC8a als auch RNF4 (siehe 3.3.1.3 und 3.3.2.3) die reprimierende Funktion von TRPS1 auf die GATA-regulierte Transkription reduzieren bzw. inhibieren. Unter Anwendung dieses funktionellen Systems sollte auch der Einfluss von TOPORS auf die regulierende Funktion von TRPS1 untersucht werden. Hierzu wurden erneut COS-7 Zellen mit dem

α D3 Reporter transfiziert und die ermittelte Luciferase-Aktivität als Referenzwert definiert (Abb. 3.23, Säule 1). Co-Transfektionen mit XGATA4 führte zu einem deutlichen Anstieg der Luciferase Aktivität (Säule 2), der durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen TRPS1 konzentrationsabhängig reduziert wurde (Säulen 3 und 5). Diese TRPS1-induzierte Reduktion wurde durch TOPORS nicht signifikant beeinflusst (Säulen 4 und 6). Kontroll-Experimente konnten einen transkriptionellen Einfluss von TOPORS alleine (Säule 7) oder in Kombination mit XGATA4 (Säule 8) ausschließen.

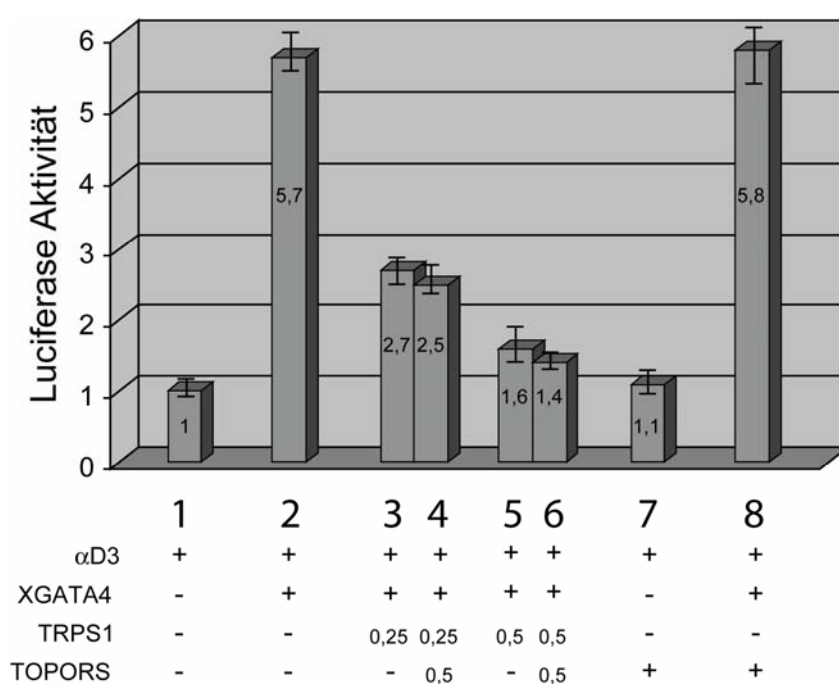


Abb. 3.23 Einfluss von TOPORS auf die TRPS1-vermittelte Repression

COS-7 Zellen wurden mit den Plasmiden α D3, XGATA4, TRPS1 und TOPORS co-transfiziert. Die ermittelte Aktivität α D3-transfizierter Zellen wurde als Referenz definiert (1). Die Zugabe von XGATA4 (0,5 μ g) führte zu einem Anstieg der Aktivität (2), der durch TRPS1 konzentrationsabhängig reduziert werden konnte (3+5). TOPORS zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die reprimierende Funktion von TRPS1 (4+6). Eine aktivierende oder reprimierende Funktion von TOPORS auf den α D3 Reporter (7) oder auf die XGATA4 induzierte Transkription (8) konnte nicht gefunden werden.

3.4 Wird TRPS1 durch TOPORS SUMOyliert?

Da TOPORS in den hier vorgestellten Analysen keinen signifikanten Einfluss auf die Funktion des TRPS1 Proteins als Repressor hatte, blieb die physiologische Relevanz dieser Interaktion vorerst unklar. Kürzlich ist es gelungen eine Funktion von TOPORS bei der SUMOylierung (SUMO, *small ubiquitin-related modifier*) spezifischer Proteine nachzuweisen (persönliche Mitteilung von E. Rubin). In unveröffentlichten *in vitro* Experimenten konnte TOPORS als E3-SUMO-Ligase von p53 und der Topoisomerase I identifiziert werden.

Interessanterweise zeigte sich in unseren Western-Blot und Immunpräzipitierungs-Experimenten, dass das TRPS1 Protein in einem Größenbereich von ca. 165-170 kDa detektiert wird, obwohl das berechnete Molekulargewicht nur ca. 142 kDa beträgt. Dieser Unterschied von ca. 25 kDa wird vermutlich durch post-translationale Modifizierungen des TRPS1 Proteins hervorgerufen die bisher noch nicht untersucht wurden.

Die im folgenden Teil aufgeführten Experimente stellen erste Analysen einer möglichen kovalenten Modifizierung des TRPS1 Transkriptionsfaktors mit einem oder mehreren SUMO Proteinen dar.

3.4.1 Potentielle SUMOylierungsstellen innerhalb des TRPS1 Proteins

Die stetige Zunahme der Anzahl bekannter SUMOylierter Proteine ließ in den vergangenen Jahren erste Analysen auf mögliche Konsensus-Sequenzen für eine SUMOylierung zu. Sampson *et al.* (2001) konnten durch den Vergleich der Primärstrukturen von elf SUMOylierten Proteinen die Oligopeptid-Sequenz ψ KXE als eine mögliche SUMO-Zielsequenz identifizieren, wobei ψ eine hydrophobe und X eine beliebige Aminosäure darstellt.

Eine Analyse der Primärstruktur des TRPS1 Proteins zeigte sieben dieser potentiellen SUMOylierungsstellen (Abb. 3.24). Der Vergleich der TRPS1 Proteine von Mensch, Maus (Trps1) und Krallenfrosch (XTrps1) zeigte, dass alle sieben im menschlichen TRPS1 Protein identifizierten SUMOylierungsstellen im Maus-Ortholog Trps1 konserviert sind und fünf dieser möglichen SUMO-Zielsequenzen auch im XTrps1 Protein gefunden werden konnten (Abb. 3.24).

hTRPS1 MVRKKNPPLRNVASEGEGQILEPIGTESKVS GKNKEFSADQMSSENTDQSD
mTrps1 MVRKKHPPLRNVASEGEGQTLEPTATESKVS GKNKELSADQMSSENTDQSD
XTrps1 MVRKKNPPLRNIASEGEAQITESAASKREDTISSEISTDPMQENSEQSG

AAELNHKEEHSLHVQDPSSSSKKDLKSAVLSEKAGFNYESPSKGGNFPSFPHDEVTDNRMLA
VAELNSKEEHSTHGQEPSSSGKKDLQISGLSEKAGFNYESPSKGGSLVSFPHDEVTDNRMLA
LVEHN.SDDHSFHDQEPSSSINKDSASLSLSERAVVNY.SHLKGRN.VYFSPMEVTDNRMLA

FSSPAAGGVCEPLKSPQRAEADDPQDMACTPSGDSLETKEQKMSPKATEETGQAQSGQANC
FSSPAAGGVCEPLKSPQRAEADDPQDMACTPSGDSLETKEEHKMSPKATEETGPVQSGQANC
LVTTDTRACDPLKSPIKSEADDTQELASSASVDSLEAKEENDMSPRATDFTVQ..CGKVDC

QGLSPVSVASKNPQVPDGGVRLNKS KTDLLVNDNPDAPLSPELQDFKCNICGYGYGNDP
QGLSPVSVASKNPQVPDGGVRLSKPKGDLVNDNPDAPLSPELQDFKCNICGYGYGNDP
QSSSPASVASDNLHVPSDGIAGLNKSQAVLLVNDNDSAPLSPELQDFKCNICGYGYGNDP

TDLIKHF RKYHLGLHNRTRQDAELDSKILALHNMVQFSH SKDFQKVNRSVLSGVLQDINSSR
TDLIKHF RKYHLGLHNRTRQDAELDSKILALHNMVQFSH SKDFQKVNRSVLSGVLQDISSSR
TDLIKHF RKYHLGLHNRTRQDVELDTKILALHNMVQFSQSKDFQKMNRSVLSGVLQDFNSPR

PVLLNGTYDVQVTSGGTFIGIGRKTPDCQGN TKYFRCKFCNFTYMGNSSTELEQHFLQTHPN
PALLNGTYDVQVTSGGTFIGIGRKTPDCQGN TKYFRCKFCNFTYMGNSSTELEQHFLQTHPN
PVLLNGTYDVQVTFGETFIGIGRKTPDCQGN TKYFRCKFCNFTYLAKSATELEQHFLKTHPN

KIKASLPSEVAKPSEKNSNKSIPALQSSDSGDLGKWQDKITVKAGDDTPVGYSVP IKPLDS
KIKVSLPSSEGVKPSKNSNKSIPALRASDSGDVGKWQDKMTVKAGDDTPVGYSVP IKPLDS
KMK...MSSDSGKPSKSTNKSSPIPRSCPGDLGKWQDKITVKAADDIPVGYSVP IKPVDS

SRQNGTEATSYWCKFCFSFCESSSSSLK LLEHYGKQHGA VQSGGLNPELNDKLSRGSVINQN
SRQNGTEATSYWCKFCFSFCESSSSSLK LLEHYGKQHGA VQSGGLNPELNDKLP RGSVINQN
CRQNGTDDTNYWCKFCFSFCESSSSSK LLEHHSKQHGGKSESPNSDLNDEIFRGSVINQN

DLAKSSEGETMTKTDKSSSGAKKKDFSSKGAEDNMVTSYN CQFCDFRYSKSHGPDVIVVGPL
DLAKSVEGEPLTKPEKGLSGAKKKDFPSKGAEDNMVTSYN CQFCDFRYSKSHGPDVIVVGPL
EITKSSDEQLPTKIDKGL..AKKKDVSSVPTEDIIVTNYNCQFCDFRYSKSHGPEVILVGPL

LRHYQQLHNIHKCTIKHCPFCPRGLCSPEKHLGEITYPFACRKSNC SHCALLLHLSPGAAG
LRHYQQLHNIHKCTIKHCPFCPRGLCSPEKHLGEITYPFACRKSNC SHCALLLHLSPGVAG
LRHYQQHNIHKCTIKHCPFCPRGLCTPEKHLGEITYPFACKKSNC SHCALLLHLSSSGTE

SSRVKHQCHQCSFTTPD VDVLLFHYESVHESQASD **VKQE** ANHLQSGDGOQSVKESKEHSCTK
SSRVKHQCHQCSFSTPD VDVLLFHYETVHESQASD **VKQE** ANHLLGSDGOQAVRDSKEHSCTK
STRVKHQCDQCSFSPD VDVLLHYENAHEAQACEI **IKQE** LNHQHGDGQPSIKEIKEHSCTK

CDFITQVEEEISRHYRAHSCYKCRQCSFTAADTQSLLEHFNTVHCQE QDITTANGEEDGHA
CDFITQVEEEISRHYRAHSCYKCRQCSFTAADTQSLLEHFNTVHCQE QEITTANGEEGGHA
CDFIVQVEEDLPRHYRRVHNCYKCRQCNTAADTQSLLDHFNSAHCQE FEITTSNGGEHHGT

IST **IKEE** PKIDFRVYNLLTPDSKMGE PVSESV **VKRE** KLEEKDGLKEKVWTESSDDLNRVNW
IPT **IKEE** PKIDLVYSLNPD SKMGETVPESIV **VKRE** KLDDKEGLKDKIWTESSDDLGRVAW
SS. **IKEE** PKTDLKVYNLVT PDSKMGEAIFDSTV **VKKE** KLEDKETLREKAWSDGSVDDLGRVAW

RGADILRGSPSYTQASLG LLLTPVSGTQEQT KTLRDSPNVEAAHLARPIYGLAVETKGFLQGA
RGADILRGSPSYTQASLG LLLTPVSSSQEQTKTLRDSPNVEAAHLARPMYGLAVDTKGFLQGA
RAPDILRTSPSYSQMGLGL LTTVSVNQDQKSSRDSPNVEAAHLARPVYGLSIEPKGFQGV

PAGG.EKSGALPQQYPASGENK **SKDESQSLRRRRG** SGVFCANCLTTKTS LWRKNANGGYVC
PAGS.EKSASLTQQYPASGESK **TKDESQSLRRRRG** SGVFCANCLTTKTS LWRKNANGGYVC
AGASGEKSGQHTPQYPTAGDSK **SKDESQSLRRRRG** SGVFCANCLTTKTS LWRKNANGGYVC

NACGLYQKLHSTPRPLNI IKQNNGEQII **RRRTRKRL** NPEALQAEQLNKQQRGSNEEQVNGSP
NACGLYQKLHSTPRPLNI IKQNNGEQII **RRRTRKRL** NPEALQAEQLNKQQRGS GEEQVNGSP
NACGLYQKLHSTPRPLNI IKQNNGEQII **RRRTRKRL** NPEALQPEQLTKHQRASSEEQANGSP

```

LERRSEDHLTESHQREIPLPSLSKYEAQGS�TKSHSAQQPVLVSQTLDIHKRMQPLHIQIKS
LERRSEDHLSSEHPREIPLPSLSKYEAQGS�TKSHSAQQPVLVSQALDIHKRMQPLHIQIKS
LDIRSEDHSMEGHQRENQQLSMNKYGSQASLTKSHSAQQTMIVSQTMIDIHKRMQPLHIQIKS

PQESTGDPGNSSSVSEGGSSERGSPIEKYMRPAKHPNYSPPGSPIEKYQYPLFGLPFVHND
PQESTGDPGNSSSVSDGKGSSERGSPIEKYMRPAKHPNYSPPGSPIEKYQYPLFGVPFVHND
PQESSGEPGNSSSVSDGKGSSERGSPIEKYMRPIKHPNYSPPGSPIEKYQYPLFGLPFVHND

FQSEADWLRFWISKYKLSVPGNPHYL SHVPGLPNPCQNYVPYPTFNLPPHFSAVGSDNDIPLD
FQSEADWLRFWISKYKLSVPGNPHYL SHVPGLPNPCQNYVPYPTFNLPPHFSAVGSDNDIPLD
FQSEADWLRFWISKYKLSVPGNPHYL SHVPGLPNPCPNYVPYPTFNLPAQYSSVGSDNDIPLD

LAIKHSRPGPTANGASKEKTKAPPNVKNEGPLNVVKTEKVDRSTQDELSTKCVHCGIVFLDE
LAIKHSRPGPTANGASKEKTKAPPTVKNEDPLNVVKTEKVDRSTQDELSTKCVHCGIVFLDE
LAMKHSRPGSGTNGDSKEKSKSPVSVKDDGPLNVTKIEKSDKSTQDELSTKCVHCGIVFLDE

VMYALHMSCHGDSGPFQCSICQHLCTDKYDFTTHIQRGLHRNNAQVEKNGKPKE ---1281
VMYALHMSCHGDSGPFQCSICQHLCTDKYDFTTHIQRGLHRNNAQAEKNGKPKE ---1281
VMYALHMSCHGESGPFQCSICQHLCTDKYDFTTHIQRGLHRNIAQAEKNGKNKD ---1271

```

Abb. 3.24 Konservierung potentieller SUMOylierungsstellen innerhalb der TRPS1 Proteine verschiedener Spezies.

Die erste Zeile zeigt die Aminosäuresequenz des menschlichen TRPS1 Proteins (hTRPS1). Die Zeilen zwei und drei zeigen die Sequenzen des mTrps1 bzw. XTrps1 Proteins der Maus bzw. des Krallenfrosches. Die unterstrichenen Bereiche zeigen die potentiellen Zinkfinger-Motive. Festgedruckte Bereiche symbolisieren die beiden den GATA-Zinkfinger flankierenden Regionen basischer Aminosäuren, die ursprünglich als NLS klassifiziert wurden. Potentielle SUMOylierungsstellen sind durch schwarze Umrahmungen und weiße Buchstaben dargestellt, wobei das putativ SUMOylierte Lysin unterstrichen wurde.

3.4.2 Western-Blot Analyse des TRPS1 Proteins zur Identifizierung einer möglichen SUMOylierung

In einem ersten Experiment zur Untersuchung der potentiellen SUMOylierung von TRPS1 wurden Extrakte aus humanen Fibroblasten bzw. T48D Zellen mittels Western-Blot unter Verwendung eines kommerziellen α SUMO (α GMP-1, Zymed) Antikörpers analysiert (Abb. 3.25). Der hier verwendete α SUMO Antikörper erkennt laut Herstellerangaben sowohl das freie als auch das kovalent an ein entsprechendes Zielprotein gebundene SUMO Protein. In Extrakten von T48D Zellen konnten so mehrere diskrete Signale unterschiedlicher Intensitäten identifiziert werden (Abb. 3.25B). Das stärkste Signal wurde hierbei im erwarteten Größenbereich des freien SUMO Proteins detektiert (Abb. 3.25B). Interessanterweise konnte ein weiteres deutliches SUMO-Signal im Größenbereich des vorher durch das entsprechende Antiserum gezeigten TRPS1 Proteins gefunden werden (Abb. 3.25A+B).

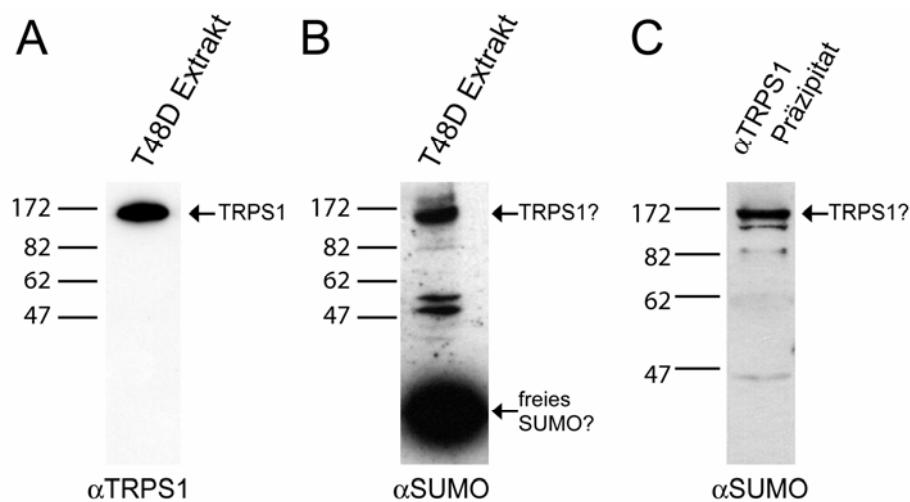


Abb. 3.25 Western-Blot Analysen zur Identifizierung einer möglichen SUMOylierung von TRPS1

Extrakte von T48D Zellen wurden mittels Western-Blot analysiert. (A) TRPS1 konnte durch das α TRPS1 Antiserum detektiert werden. (B) Die Verwendung eines α SUMO Antikörpers identifizierte mehrere distinkte Signale, wobei eines im erwarteten Bereich von TRPS1 zu finden war (Pfeil). (C) Eine Untersuchung von α TRPS1 Präzipitaten dieser Extrakte konnte durch die Verwendung des α SUMO Antikörpers erneut ein deutliches Signal im Größenbereich von TRPS1 aufzeigen (Pfeil).

In sich anschließenden Analysen sollte untersucht werden, ob dieses im Bereich des TRPS1 Protein detektierte Signal das SUMOylierte TRPS1 zeigt. Hierzu wurden 500 μ g T48D Zelleextrakt mit einem monoklonalen α TRPS1 Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend sedimentiert. Die so erhaltenen α TRPS1 Präzipitate wurden erneut mittels Western-Blot Analysen unter Verwendung des α SUMO Antikörpers untersucht. Durch die beschriebenen Experimente konnte erneut ein deutliches Signal im Größenbereich des TRPS1 Transkriptionsfaktors identifiziert werden (Abb. 3.25C).

4. Diskussion

Der TRPS1 Transkriptionsfaktor reprimiert die GATA-abhängige Transkription (Malik *et al.*, 2001). TRPS1 bindet über den GATA-Zinkfinger (Zf7) an die GATA-Konsensus-Sequenz und besitzt acht weitere potentielle Zinkfinger-Motive, die möglicherweise Regionen für Interaktionen zu anderen Proteinen sind.

Die Transkription in Eukaryoten findet innerhalb des Zellkerns statt, doch die Synthese der Proteine erfolgt an den Ribosomen im Zytoplasma. Infolgedessen muss ein Transkriptionsfaktor zur Ausübung seiner Funktion durch die Kernmembran hindurch in den Zellkern gelangen. Die Kernmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, die eine Vielzahl so genannter Kernporenkomplexe (NPCs, *nuclear pore complexes*) enthält. Obwohl die Struktur dieser NPCs einen passiven Transport von Molekülen einer Größe bis zu 60 kDa ermöglicht, sind nur wenige Moleküle bekannt die über Diffusion in den Zellkern gelangen (Cokol *et al.*, 2000). Der Transport durch die Kernmembran ist in der Regel ein aktiver und durch spezifische Signalkaskaden regulierter Prozess. Die für den Transport in den Zellkern bestimmten Proteine enthalten spezifische Signalsequenzen, die Kernlokalisierungssequenzen (NLS), welche von den Import-Rezeptoren (Importinen) erkannt werden. Der Vergleich einer Vielzahl bekannter NLS konnte zwar keine Konsensus-Sequenz identifizieren, doch es zeigte sich, dass einfache NLS in der Regel Hexapeptide sind die mindestens vier basische Aminosäuren (Arginin, Lysin und auch Histidin) enthalten (Boulikas, 1993 und 1994).

4.1 TRPS1 besitzt ein funktionelles Kernlokalisierungssignal

Sowohl das endogene als auch das exogene TRPS1 Protein in transient transfizierten Säugerzellen konnten fast ausschließlich im Zellkern detektiert werden. Eine Analyse der Primärstruktur des TRPS1 Proteins identifizierte zwei einfache potentielle NLS (NLS1 + 2). Eine Deletion der vier C-terminalen Aminosäuren des NLS1 Hexapeptids (LRRRRG, aa 886-891) zeigte keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisierung. Dagegen führte eine Substitution des Arginins an der letzten Position der vorhergesagten NLS2 (RRRTRKR, aa 946-952) zu einer vollständigen Verhinderung des Importes von TRPS1 in den Zellkern. Die hier beschriebenen Analysen machten

deutlich, dass nur NLS2 als funktionelles Kernlokalisierungssignal für das TRPS1 Proteins fungiert.

TRPS Typ I ist assoziiert mit Deletionen oder *Nonsense*-Mutationen innerhalb eines Allels des *TRPS1* Gens. Das Fehlen einer funktionellen Gen-Kopie (Haplo-Insuffizienz) führt vermutlich zu einer reduzierten Konzentration des TRPS1 Proteins innerhalb des Zellkerns. Patienten mit TRPS Typ III zeigen eine schwerere Brachydaktylie und ein geringeres Längenwachstum als Patienten mit TRPS Typ I. TRPS Typ III wird durch *Missense*-Mutationen innerhalb des DNA-bindenden GATA-Zinkfingers hervorgerufen (Lüdecke *et al.*, 2001). Das mutierte und somit nicht mehr funktionelle TRPS1 Protein kompetitiert wahrscheinlich mit dem Wildtyp-Protein um die Interaktionen zu bestimmten DNA-Sequenzen oder Bindepartnern. Kommt es hierbei, wie beim TRPS Typ III, zur Ausbildung eines Krankheitsbildes/Syndroms, spricht man von einem dominant-negativen Effekt.

In Patienten mit TRPS Typ I konnten erstmalig zwei *Missense*-Mutationen (2854C>T→R952C und 2855G>A→R952H) außerhalb der für den GATA-Zinkfinger kodierenden Region identifiziert werden. Die aus diesen Mutationen resultierenden Substitutionen des Arginins 952 verhinderten den Transport des TRPS1 Transkriptionsfaktors in den Zellkern. Dies bewirkt vermutlich eine reduzierte Konzentration von TRPS1 im Kern und stimmt mit dem für TRPS Typ I beschriebenen Modell der Haplo-Insuffizienz überein.

Die beschriebene Mutation in der Splice-Donor Sequenz im sechsten Intron von *TRPS1* (IVS6+1 G>T) führt zu einem Überspringen des sechsten Exons im Splicing-Prozess und somit zu einem um 41 aa verkürzten Genprodukt. Diesem TRPS1 Protein fehlen neben dem GATA-Zinkfinger auch die letzten vier aa des NLS1 Hexapeptids (Lüdecke *et al.*, 2001). Die Patientin mit dieser Mutation hat einen TRPS Typ I und damit einen milderen Phänotyp als Patienten mit einer Aminosäure-Substitution innerhalb des GATA-Zinkfingers (TRPS Typ III). Mögliche Erklärungen dieser Beobachtung wären eine nicht korrekte Faltung des verkürzten TRPS1 Proteins, welches nicht mit dem Wildtyp-Protein um die Bindung anderer Komponenten kompetitieren kann oder über spezifische Schutzmechanismen der Zelle degradiert wird (Clausen *et al.*, 2002). Beide Modelle würden eine Reduktion des funktionellen TRPS1 Transkriptionsfaktors im Zellkern bewirken.

Dass in den hier gezeigten Experimenten keine Reduzierung der Konzentration des Δ Exon6-TRPS1-GFP Proteins beobachtet wurde kann sowohl auf die Überexpression und eine somit nicht physiologische Konzentration des TRPS1-GFP Fusionsproteins innerhalb der Zelle, als auch auf einen stabilisierenden Effekt des an den C-Terminus fusionierten GFP Proteins zurückzuführen sein (Margolin, 2000).

4.2 Identifizierung von Interaktionspartnern des TRPS1 Proteins

Die jeweiligen Funktionen eines Transkriptionsfaktors werden über dessen Interaktionen zu unterschiedlichen Bindepartnern reguliert. Zur Identifizierung putativer TRPS1-Bindeproteine wurden zwei überlappende Fragmente des murinen Orthologen in einem Hefe Zwei-Hybrid System als Köder verwendet (F4 und F5). Es wurde hierbei angenommen, dass es die große Homologie zwischen dem menschlichen und dem murinen TRPS1/Trps1 Protein und die gezeigte evolutionäre Konservierung der potentiell funktionellen Regionen in anderen Spezies (siehe Abb. 3.24) erlauben würden, die durch das Maus Ortholog identifizierten Trps1-Bindepartner in menschlichen Zellen verifizieren zu können. Durch die Auswertung der 28 gefundenen Hefe-Klone konnten sieben potentielle Trps1 Bindeproteine identifiziert werden.

4.2.1 Das N-terminale Trps1 Fragment F4 interagiert mit Pcbp1

Mit dem Trps1 Fragment F4, welches die 675 N-terminalen aa und somit die Zinkfinger-Motive 1-4 enthält, konnte das RNA-bindende α -CP1 Protein (Pcbp1, Makeyev *et al.*, 1999) identifiziert werden. Pcbp1 gehört zur Gruppe der poly(rC)-bindenden Proteine. Für diese spezifische Klasse von Proteinen sind mehrere unterschiedlicher Funktionen bekannt. Poly(rC)-bindende Proteine regulieren die Stabilität verschiedener mRNAs und können sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Translation wirken (Makeyev und Liebhaber, 2002). Darüber hinaus konnte die Interaktionen dieser Klasse von Proteinen zum TATA-bindenden Protein (Michelotti *et al.*, 1996) und mehreren Transkriptionsrepressoren (z.B.: Zik-1, Denisenko *et al.*, 1996; Eed, Denisenko und Bomsztyk, 1997) gezeigt werden. Die Identifizierungen dieser Interaktionen führten zu der Annahme, dass die Gruppe der poly(rC)-bindenden

Proteine nicht nur regulative Funktionen in der Translation sondern auch in der Transkription übernehmen.

Ob und inwiefern die noch näher zu charakterisierende Interaktion von TRPS1 mit Pcbp1 die transkriptionelle Funktion von TRPS1 moduliert wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert.

4.2.2 Für das C-terminale Trps1 Fragment F5 konnten sechs Bindeproteine identifiziert werden

Sechs der sieben potentiellen Trps1 Bindeproteine konnten mit dem Trps1 Fragment F5 identifiziert werden, das die C-terminalen 647 aa und somit den DNA-bindenden GATA-Zinkfinger (Zf 7), den IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger (Zf 8+9) und drei weitere putative Zinkfinger-Motive (Zf 4–6) enthält.

4.2.2.1 Punc, Arkadia und A1up interagieren mit der IKAROS-ähnlichen Region von Trps1

Die im Hefe Zwei-Hybrid System gefundenen Interaktionen von Trps1 zu den Proteinen Punc (1), Arkadia (2) und A1up (3) konnten in einem weiteren induzierbaren Hefe *in vivo* System auf die C-terminalen 100 aa des Trps1 Proteins eingegrenzt werden. Da die hier aufgeführten Interaktionen bisher nicht detailliert untersucht wurden, sollen im folgenden Abschnitt nur kurz die bereits bekannten Funktionen der einzelnen Proteine beschrieben werden.

1) Das putative neuronale Zell-Ahdäsions Molekül Punc (Salbaum, 1998) ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Es ist am stärksten im sich entwickelnden Nervensystem aber auch im Mesoderm der Extremitätenknospen exprimiert. Die Expression ist in den embryonalen Stadien E9,5 und E10,5 nachweisbar, wird am Tag E11,5 stark herunterreguliert (Salbaum, 1998) und ist ab dem Stadium E16,5 auf das Gehirn und das Innenohr beschränkt (Yang *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Beobachtung wurde Punc ursprünglich eine wichtige Rolle in der frühen Embryogenese zugeschrieben (Salbaum, 1998). Allerdings zeigten homozygot *Punc* mutierte Mäuse

keine morphologischen Auffälligkeiten (Yang *et al.*, 2001). Yang *et al.* diskutierten eine Rolle von Punc in der motorischen Koordination, die derzeit analysiert wird.

2) Arkadia ist ein evolutionär hoch konserviertes nukleäres Protein, das eine essentielle Funktion in der Strukturierung des Embryos übernimmt (Episkopou *et al.*, 2001). Über die Induktion der Expression des Transkriptionsfaktors HNF3B reguliert Arkadia die Bildung des Hensenschen Knotens, einer speziellen Struktur in der Embryogenese (äquivalent dem Spemanns Organisator des Frosches) die unter anderem die Achsen-Spezifizierung reguliert (Episkopou *et al.*, 2001). Arkadia potenziert die durch das Mesendoderm induzierte Aktivität einer Gruppe von TGF- β Faktoren. Die kombinierte Aktivität von Arkadia und einem β -Wachstumsfaktor-ähnlichen Protein namens Nodal führt zur Expression der für das Mesendoderm spezifischen Gene und supprimiert die Expression der Gene des Mesoderms (Niederländer *et al.*, 2001).

3) A1up wurde in einem Hefe Zwei-Hybrid Experiment als Interaktionspartner des Ataxin-1 Proteins identifiziert (Davidson *et al.*, 2000). Eine Analyse der Primärstruktur des A1up Proteins zeigte eine Ubiquitin-ähnliche Region am N-Terminus sowie eine Ubiquitin-assoziierte (UBA)-Region im C-terminalen Bereich. Folglich wurde von Davidson *et al.* (2000) eine Funktion von A1up in der Regulation der Degradierung von Ataxin-1 über das Proteasom postuliert. Des Weiteren konnten im A1up Protein so genannte Stil-ähnliche Regionen gezeigt werden, die auf eine mögliche Interaktion zur ATPase Domäne von Chaperonen hinweisen.

4.2.3 Die TRPS1-LC8a Interaktion

Die im Hefe Zwei-Hybrid System gefundene Interaktionen von Trps1 und Lc8a wurde in nachfolgenden *in vivo* und *in vitro* Analysen verifiziert. Zusätzlich konnte die Interaktion der humanen Orthologe TRPS1 und LC8a in immunchemischen Analysen von Extrakten transfizierter COS-1 und nativer humaner Fibroblasten bestätigt werden.

Das 89 aa große LC8a Protein ist das humane Ortholog der M_r 8.000 leichten Kette des Flagellen-Dyneins in *Chlamydomonas reinhardtii*, welches auch in Rindern und Ratten

als essentieller Bestandteil des zytoplasmatischen Dynein-Komplexes identifiziert wurde (King *et al.*, 1996). Es zählt zu den evolutionär am besten konservierten Proteinen und ist identisch in Maus, Ratte, Schwein, Rind und Mensch (Wilson *et al.*, 2001). Die unabhängige Identifizierung dieses Proteins durch mehrere Arbeitsgruppen in einer Vielzahl von Organismen und in unterschiedlichen Regulationssystemen, führte zur Entstehung mehrere Synonyme wie DLC8 (Fan *et al.*, 2001), Dlc-1 (Crépieux *et al.*, 1997), hdlc1 (Dick *et al.*, 1996) und Protein-Inhibitor der neuronalen Stickstoffoxid-Synthase PIN (Jaffrey und Snyder, 1996). Bis heute konnten mehr als zehn Moleküle unterschiedlichster Größe und Funktion als Interaktionspartner des LC8a Proteins identifiziert werden. Einige dieser Interaktionen scheinen mit dem durch den Mikrotubuli-Komplex ermöglichten intrazellulären Transport assoziiert zu sein. So wird beispielsweise angenommen, dass LC8a in den Transport der neuronalen Stickstoffoxid-Synthase nNOS (Rodríguez-Crespo *et al.*, 2001) und des Inhibitors des NFκB Transkriptionsfaktors IκBα involviert ist (Crépieux *et al.*, 1997). In Zellen der Nebenschilddrüse interagiert LC8a mit dem 3'-nicht-translatierten Bereich der Parathormon (PTH) mRNA und transportiert sie die Mikrotubuli entlang (Epstein *et al.*, 2000). Sogar Lyssa RNA-Viren und das afrikanische Schweine-Fieber-Virus (ASFV), werden über LC8a innerhalb der Zelle transportiert (Jacob *et al.*, 2000; Raux *et al.*, 2000; Poisson *et al.*, 2001; Alonso *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte LC8a im Gehirn des Huhns in Assoziation mit Myosin-Va, einem Aktin-basierten Motorprotein, nachgewiesen werden (Espindola *et al.*, 2000).

Trotz der zahlreich aufgeführten Funktionen in intrazellulären Transportprozessen ist LC8a mehr als ein einfaches Transportmolekül. LC8a interagiert mit Bim, einem Molekül der Bcl-2-Familie und reguliert so dessen pro-apoptotische Funktion (Puthalakath *et al.*, 1999) und regelt über die Modulation des Phosphorylierungszustandes von nNOS dessen Aktivität (Yu *et al.*, 2002). Zusätzlich konnte LC8a als Interaktionspartner der funktionell und strukturell verwandten Transkriptionsfaktoren NFR-1 (*nuclear respiratory factor*) und EWG (*erect wing gene product* bei *Drosophila*) identifiziert werden (Herzig *et al.*, 2000).

Analyse der Interaktion von TRPS1 und LC8a

LC8a wurde ursprünglich als ein ausschließlich zytoplasmatisches Protein beschrieben (King *et al.*, 1996; Dick *et al.*, 1996; Jaffrey and Snyder, 1996), wogegen Crépieux *et al.* (1997) und Herzig *et al.* (2000) LC8a sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachwiesen. Diese unterschiedlichen Beobachtungen favorisieren eine Zelltyp- und/oder Zellzyklus-abhängige Lokalisierung des LC8a Proteins. Auch in unseren Analysen wurden unterschiedliche Verteilungen des LC8a Moleküls beobachtet. So zeigten *LC8a* transfizierte COS-1 Zellen eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisierung, wobei eine Co-Transfektion mit *TRPS1* die Translokation eines großen Anteils des zytoplasmatischen LC8a in den Zellkern bewirkte (siehe Abb. 3.9). Diese Beobachtung führte zur Hypothese eines TRPS1-abhängigen Transportes von LC8a in den Zellkern. Allerdings zeigen die hier beschriebenen Experimente beide Proteine in einer nicht-physiologischen Konzentration. In bereits geplanten Analysen TRPS1-defizienter Zellen (*TRPS1* “knock-out“ Zellen) soll die intrazelluläre Verteilung des endogenen LC8a Proteins untersucht werden, um einen möglichen Einfluss von TRPS1 auf den LC8a-Import in den Zellkern zu prüfen.

Lokalisierungsstudien in nativen humanen Fibroblasten zeigten das endogene LC8a in einer homogenen Verteilung innerhalb des Zytoplasmas. Zusätzlich konnte LC8a in ca. 60 % der analysierten Zellen im Kern identifiziert werden. Innerhalb des Zellkerns bildet LC8a größere rundliche Strukturen, wie sie auch für das TRPS1 Protein identifiziert werden konnten. Co-Lokalisierungsanalysen ergaben dass es innerhalb dieser Strukturen zur TRPS1-LC8a Interaktion kommt. Eine Überlagerung der zytoplasmatischen Signale beider Proteine wurde nicht beobachtet.

Die bisher identifizierten LC8a-Binderegionen in den jeweiligen Interaktionspartnern beschränken sich auf kurze Bereiche dieser Proteine. Rodríguez-Crespo *et al.* (2001) erkannten durch die Anwendung einer speziellen Peptid-Scan Technik zwei unterschiedliche Konsensus-Sequenzen. Die Peptidsequenz GIQVD konnte in nNOS und GKAP und die Aminosäureabfolge KSTQT beispielsweise in den Proteinen Bim und Swallow identifiziert werden. Fan *et al.* (2001) konnten in einer unabhängigen Arbeit die Peptidsequenz DKSTQT des Bim Proteins als minimale LC8a-interagierende

Region aufzeigen. Unsere Analysen ergaben zwei getrennte LC8a-interagierende Regionen im TRPS1 Protein, welche den DNA-bindenden GATA-Zinkfinger flankieren. Region A (aa 635-723) beinhaltet die Zinkfinger-Motive 4-6, zeigte aber keine der beschriebenen LC8a-Konsensus-Sequenzen. Region B (aa 1182-1281) birgt den IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger und die Aminosäureabfolge DRSTQ (aa 1206-1210), welche sehr homolog zur LC8a-interagierenden Region von Bim ist.

LC8a reprimiert die Funktion des Transkriptionsfaktors TRPS1

In den hier vorgestellten Experimenten konnte ein Einfluss von LC8a auf das Bindeverhalten von TRPS1 zur GATA-Konsensus-Sequenz nachgewiesen werden. Diese Reduzierung der Bildung von TRPS1-DNA Komplexen führte zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der reprimierenden Funktion von TRPS1 in der GATA-abhängigen Transkription. LC8a hatte dabei weder Einfluss auf die GATA-abhängige Transkription noch auf die Expression des Reporters. Somit konnte der beobachtete Effekt auf die TRPS1-LC8a Interaktion zurückgeführt werden. Möglicherweise induziert LC8a eine Konformationsänderung des TRPS1 Proteins, die eine Reduzierung der TRPS1-Funktion in der Transkription bewirkt. Ein Einfluss von LC8a auf die Faltung von Proteinen konnte bereits durch Makokha *et al.* (2002) gezeigt werden. Die Autoren beschrieben eine Chaperon-ähnliche Funktion von LC8a für das IC74 Protein (*intermediate chain 74*) des Dynein-Motor Komplexes.

Beeinflusst die TRPS1-LC8a Interaktion die Funktion von LC8a in der Bcl-2 regulierten Apoptose?

Obgleich der Vielzahl bekannter Bindepartner des ubiquitär exprimierten *LC8a* Genproduktes (Crépieux *et al.*, 1997) sind die genauen Funktionen dieser Interaktionen unklar. Die hohe evolutionäre Konservierung von LC8a deutet auf eine fundamentale physiologische Funktion hin. Das humane *LC8a* Gen wurde auf Chromosom 14q24 identifiziert (Dick *et al.*, 1996). Bisher ist keine Erkrankung bekannt die auf einem Defekt des *LC8a* Gens beruht. Die Bedeutung von LC8a in der Entwicklung konnte durch gezielte Mutationen innerhalb des *ddlc1* Gens, dem *Drosophila* Ortholog von

LC8a, gezeigt werden. Mutationen die einen teilweisen Funktionsverlust bewirkten führten zu morphologischen Defekten. Ein vollständiger Funktionsverlust induzierte eine verstärkte Apoptose und war embryonal letal (Dick *et al.*, 1996).

Die Expression von *Trps1* wurde hauptsächlich in der Gesichtsregion, den sich entwickelnden Gliedmaßen und in den Haarfollikeln nachgewiesen, also den Geweben die in den TRP Syndromen betroffen sind (Malik *et al.*, 2001; Kunath *et al.* 2002). Sowohl das Längenwachstum der Knochen als auch die Morphogenese der Haarfollikel werden durch eine kontrollierte Regulation der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose gesteuert. LC8a reguliert die Apoptose über die Interaktion mit dem pro-apoptotischen Faktor Bim. In einer gesunden Zelle ist Bim über LC8a am Dynein-Komplex immobilisiert und somit inaktiv. Durch verschiedene apoptotische Stimulierungen kommt es zur Freisetzung der LC8a-Bim Komplexe und zur Assoziation mit Bcl-2. Bcl-2 verliert durch diese Interaktion seine anti-apoptotische Funktion und die Apoptose wird eingeleitet (Puthalakath *et al.*, 1999). Die Regulation der Chondrozyten-Entwicklung erfolgt unter anderem über die von Bcl-2 gesteuerte Apoptose. Bcl-2 verzögert hier die Reifung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge. Ein Verlust der Bcl-2-Funktion bewirkt ein beschleunigtes Reifen der Chondrozyten und einen dadurch bedingten frühzeitigen Verschluss der Wachstumsfuge, der zu einem verkürzten Knochwachstum führt (Amling *et al.*, 1997). Des Weiteren spielt die von Bcl-2 regulierte Apoptose bei der Regulation des Haarfollikel-Zyklus eine fundamentale Rolle. So zeigten Bcl-2-defiziente Mäuse ein stark retardiertes Haarwachstum (Müller-Röver *et al.*, 1999).

Eine Störung innerhalb der von Bcl-2 regulierten Apoptose, die einen frühzeitigen Verschluss der Wachstumsfuge induziert, wäre ein erster möglicher Erklärungsansatz der beschriebenen Brachydaktylie und des reduzierten Längenwachstums bei Patienten mit TRPS. Ein Defekt in der Bcl-2-Regulationskaskade könnte auch zur beobachteten spärlichen Kopfbehhaarung bei Patienten mit TRPS beitragen.

4.2.4 Die Interaktion von TRPS1 und RNF4

Im hier beschriebenen Hefe Zwei-Hybrid System konnte das RINGfinger Protein 4 (Rnf4) als ein weiteres Bindeprotein des Trps1 Transkriptionsfaktors identifiziert werden. Rnf4 wurde ursprünglich in der Ratte identifiziert und dort als SNURF (*small nuclear RING finger protein*) bezeichnet. Es zeigt eine hohe Homologie zum menschlichen (91 %) und murinen (96 %) RNF4/Rnf4 Protein (Moilanen *et al.*, 1998; Chiaritoti *et al.*, 1998). Die Interaktion des humanen TRPS1 und RNF4 Proteins konnte durch immunchemische Analysen von Extrakten entsprechend transfizierter COS-1 Zellen und nativer humaner Fibroblasten gezeigt werden.

Analyse der Interaktion von TRPS1 und RNF4

Untersuchungen der intrazellulären Lokalisationen von TRPS1 und RNF4 zeigten, dass beide Proteine in entsprechend transfizierten Zellen ausschließlich im Kern zu finden waren. Allerdings identifizierten die hier aufgeführten Analysen (siehe Abb. 3.16) nativer Fibroblasten das endogene RNF4 Protein sowohl im Zytoplasma als auch in einer Vielzahl kleiner rundlicher Strukturen innerhalb des Zellkerns. Diese intrazelluläre Verteilung des endogenen RNF4 Proteins wurde bereits zuvor durch Moilanen *et al.* (1998) in CV-1 Zellen beschrieben. Wie bereits diskutiert konnte auch das endogene TRPS1 in rundlichen Strukturen innerhalb der Zellkerne humaner Fibroblasten identifiziert werden, wobei die für RNF4 gezeigten Strukturen wesentlich kleiner und zahlreicher waren. Leider konnten bis zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit keine Co-Lokalisierungsstudien der endogenen Genprodukte durchgeführt werden, da beide verfügbaren Antiseren in Kaninchen generiert wurden und somit keine spezifische Farbmarkierung mit einem Zweit-Antikörper möglich war.

Da beide Proteine aus Extrakten humaner Fibroblasten erfolgreich co-präzipitiert werden konnten gehen wir davon aus, dass eine teilweise Überlappung beider Strukturen innerhalb des Zellkerns erfolgt, wobei die gezeigte Interaktion nicht die Hauptfunktion beider Proteine ist.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Trps1 Fragmente in Hefe *in vivo* Analysen konnte der mit Rnf4 interagierende Bereich auf eine 200 aa überspannende Region im Trps1 Protein (aa 985 - 1184) eingegrenzt werden, die kein bekanntes Protein-interagierendes Motiv enthält.

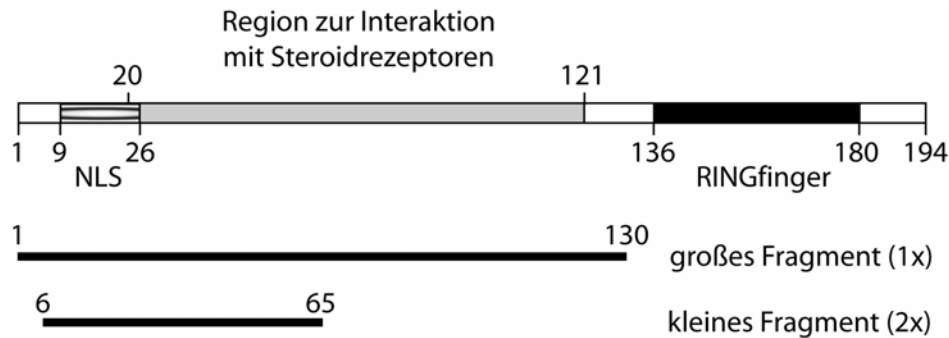


Abb. 4.1 Schematische Darstellung des RNF4 Proteins und die identifizierte Trps1-bindende Region

Das geteilte Kernlokalisierungssignal (NLS) des RINGfinger Proteins 4 ist in der Region aa 9 – 26 lokalisiert (schraffiert). Die erste der beiden Regionen zur Interaktion mit anderen Proteinen (aa 20 – 121) wurde ursprünglich über die Assoziation mit Steroidrezeptoren gefunden (grau). Der eigentliche RINGfinger im C-terminalen Bereich des Proteins (aa 136 -1 80) bildet die zweite Protein-bindende Region (schwarz). Es konnten zwei unterschiedliche mit Trps1 interagierende Klone identifiziert werden (kleines und großes Fragment), die den Bereich der Trps1-Rnf4 Interaktion auf eine 60 aa überspannende Region (aa 6 – 65) im Rnf4 Protein eingrenzen.

Das RNF4 Protein enthält zwei getrennte Bereiche die als Protein-interagierende Regionen klassifiziert wurden (Abb. 4.1). Mit dem RINGfinger des C-Terminus assoziieren beispielsweise das TATA-Bindeprotein (Moilanen *et al.*, 1998), SPBP (Lyngsø *et al.*, 2000) und Sp1 (Poukka *et al.*, 2000). Die zweite bekannte Region, welche auch mit TRPS1 interagiert, liegt im N-terminalen Teil von RNF4 und wurde ursprünglich als Bindedomäne für Androgenrezeptoren beschrieben (Moilanen *et al.*, 1998). In den letzten Jahren konnten die Interaktionen der Transkriptionsrepressoren Gscl (Galili *et al.*, 2000) und PATZ (Fedele *et al.*, 2000) hinzugefügt werden. In den hier aufgezählten Interaktionen fungiert RNF4 als ein die Funktion des jeweiligen Bindepartners unterstützender bzw. verstärkender Co-Faktor. Des Weiteren zeigt RNF4 in Anwesenheit von Androgenen eine starke Aktivierung der Androgenrezeptor (AR)-abhängigen Transkription (Moilanen *et al.*, 1998). Interessant ist hier, dass Chang *et al.* eine AR-vermittelte Repression der *TRPS1*-Expression in Androgen-abhängigen humanen Prostata Krebszellen (LNCaP-FGC Zellen) zeigen konnten. Weitere

Untersuchungen an einer Ratte zeigten, dass ein durch Kastration bedingter Entzug von Androgenen zu einer Aktivierung der *TRPS1*-Expression, einer Regression der Prostata und einer ansteigenden Apoptose-Rate führt (Chang *et al.*, 1997 und 2000). Wenn RNF4 eine reprimierende Funktion auf die *TRPS1*-Expression hat, betrifft diese vermutlich nicht direkt das *TRPS1* Gen sondern wirkt über andere AR-RNF4-regulierte Faktoren, da RNF4 bisher nur als Aktivator der AR-abhängigen Transkription beschrieben wurde.

RNF4 inhibiert die TRPS1-vermittelte Repression

Fedele *et al.* (2000) zeigten eine trans-aktivierende Wirkung von RNF4 für den *c-myc* Promoter. Diese Aktivierung wurde durch Zugabe des Repressors PATZ zu einer starken Co-Repression umgekehrt. Da auch TRPS1 als Transkriptionsrepressor beschrieben ist erwarteten wir einen co-reprimierenden Effekt von RNF4. Die Auswertung des Reporter-Assays zeigte allerdings einen inhibierenden Effekt von RNF4 auf die reprimierende Funktion von TRPS1. Zusätzlich zeigte RNF4 einen aktivierenden Einfluss auf die GATA-abhängige Transkription. Die durch RNF4 induzierte Zunahme der GATA-abhängigen Transkription um 26-32 % ist allerdings zu gering, um die vollständige Inhibierung der TRPS1-vermittelten Repression zu erklären. Dieses Ergebnis kann nur durch einen direkten Einfluss von RNF4 auf den Transkriptionsfaktor TRPS1 erklärt werden.

Im Gegensatz zu den bereits aufgeführten Ergebnissen von Fedele *et al.* (2000) konnten Moilanen *et al.* (1998) keine trans-aktivierende Funktion des RNF4 bzw. SNURF Proteins, welches mit der DNA-bindenden Domäne des Gal4 Proteins fusioniert wurde, nachweisen. In den von uns durchgeführten Experimenten konnte ebenfalls kein trans-aktivierender Einfluss von RNF4 auf das hier verwendete Reporter-Konstrukt festgestellt werden.

Die Vielzahl an identifizierten mit RNF4 interagierenden Transkriptionselementen unterstreicht die Funktion von RNF4 in der Regulation bzw. Koordination der Expression. Ein direkter Bezug der TRPS1-RNF4 Interaktion zu TRPS konnte bisher allerdings nicht hergestellt werden.

4.2.5 Die Interaktion von TRPS1 und TOPORS

Zwei der identifizierten Klone enthielten Plasmide die für einen Teil (aa 930-1006 von 1045) des Topoisomerase I bindenden RS-Proteins (Topors) kodierten. TOPORS wurde ursprünglich als ein mit der Topoisomerase I interagierendes Protein beschrieben (Haluska *et al.*, 1999). Etwa zeitgleich veröffentlichten Zhou *et al.* (1999) eine N-terminal verkürzte Form von TOPORS als ein p53-assoziiertes Protein (p53BP3). Durch die Verwendung verkürzter Trps1 Fragmente konnte die mit Topors interagierende Region auf die 100 C-terminalen aa des Trps1 Proteins eingegrenzt werden.

Analyse der Interaktion von TRPS1 und TOPORS

Unsere Analysen der intrazellulären Verteilung konnten ektopisches TOPORS ausschließlich im Nukleus transfizierter Säugerzellen identifizieren. Innerhalb des Zellkerns konnte TOPORS, im Gegensatz zur homogenen Verteilung des ektopischen TRPS1 Proteins, in zahlreichen rundlichen Strukturen nachgewiesen werden. Co-Lokalisierungsstudien von Rasheed *et al.* (2002) zeigten, dass es sich bei diesen Strukturen um PML-Kernkörperchen handelt. Die Autoren identifizierten sowohl das GFP-TOPORS Fusionsprotein als auch das endogene TOPORS innerhalb dieser Strukturen. Jede Säugerzelle beinhaltet üblicherweise 10 – 30 der 0,2 – 1,0 µm großen PML-Kernkörperchen, deren Größe und Anzahl während des Zell-Zyklus variiert (Koken *et al.*, 1995). Analysen von Zellen *PML*-defizienter Mäuse zeigten keine PML-Kernkörperchen, wodurch eine essentielle Funktion des PML Proteins für die Bildung dieser Strukturen abgeleitet werden konnte (Wang *et al.*, 1998).

Interessanterweise zeigten unsere Untersuchungen von *TRPS1+TOPORS* co-transfizierten Zellen das TRPS1-Protein, ähnlich wie TOPORS, ausschließlich in kleinen rundlichen Strukturen. Eine Überlagerung der TRPS1- und TOPORS-Signale zeigte, dass es innerhalb dieser Strukturen zur Co-Lokalisierung kam. Da nur die Co-Expression von *TOPORS* einen solchen Einfluss auf die Lokalisation von TRPS1 hatte, gehen wir derzeit von einer konzentrationsabhängigen Funktion von TOPORS für die intranukleäre Verteilung von TRPS1 aus. Co-Lokalisationsstudien zur Untersuchung der Verteilung der endogenen Proteine (TRPS1 und TOPORS) konnten bisher nicht durchgeführt werden, da beide verfügbaren Antiseren in Kaninchen generiert wurden

und somit eine spezifische Markierung der einzelnen Proteine durch einen Zweit-Antikörper nicht möglich war.

Da endogenes TOPORS in den PML-Kernkörperchen gezeigt werden konnte wurden Co-Lokalisierungsstudien zur Untersuchung der endogenen Proteine PML und TRPS1 durchgeführt. Das endogene TRPS1 konnte dadurch nicht nur in den bereits beschriebenen größeren Strukturen innerhalb des Zellkerns gezeigt werden, sondern war auch in einer variierenden Anzahl der PML-Kernkörperchen detektierbar (Abb. 3.22F). Zusätzlich konnten innerhalb der größeren von TRPS1 gebildeten Strukturen einige PML-Signale lokalisiert werden (Abb. 3.22D+E).

Trotz der beobachteten Lokalisierung von TRPS1 innerhalb der PML-Kernkörperchen sprechen unsere derzeitigen Ergebnisse gegen eine direkte TRPS1-PML Interaktion. Unsere Analysen transfizierter Säugerzellen zeigten TRPS1 nur dann innerhalb der PML-Kernkörperchen wenn gleichzeitig eine Überexpression von *TOPORS* erfolgte. Dagegen konnte TOPORS in allen Versuchsansätzen innerhalb dieser Strukturen gezeigt werden. Diese Beobachtung führte zur Hypothese einer TOPORS-abhängigen Assoziation von TRPS1 mit den PML-Kernkörperchen, bei der keine direkte Interaktion von TRPS1 zum PML erfolgt. Analysen unterschiedlicher Zellen (auch Fibroblasten) zeigten eine sehr schwache aber ubiquitäre Expression von *TOPORS* (E. Rubin, persönliche Mitteilung). Die in unseren Analysen verwendeten nativen humanen Fibroblasten zeigten eine starke *TRPS1*-Expression. Analysen zur Verteilung des endogenen TRPS1 zeigten, dass nur ein geringerer Anteil innerhalb der PML-Kernkörperchen nachgewiesen werden konnte. Eine konzentrationsabhängige Funktion von TOPORS als eine Art Ankerprotein für TRPS1 zur Assoziation mit den PML-Kernkörperchen, wäre eine mögliche Erklärung für diese und der in transfizierten Zellen ermittelten Ergebnisse.

Wird TRPS1 durch die E3-SUMO-Ligase TOPORS SUMOyliert?

Kürzlich durchgeführte *in vitro* Analysen konnten TOPORS als eine spezifische E3-Ligase bei der SUMOylierung der beiden bisher identifizierten TOPORS-Bindeproteine Topoisomerase I und p53 identifizieren (E. Rubin, persönliche Mitteilung).

Die von uns in unterschiedlichen Hefe Systemen gezeigte Interaktion von TRPS1 und TOPORS konnte in Extrakten transfizierter COS-7 Zellen und nativer T48D Zellen verifiziert werden. Die Verwendung eines α TOPORS Antiserums in Western-Blot Analysen von T48D Extrakten identifizierte zwei Signale im Größenbereich des TOPORS Proteins (siehe 3.19F, Pfeile a + b). Diese Beobachtung wird auf eine derzeit favorisierte Co-Existenz einer SUMOylierten- und nicht SUMOylierten-Form von TOPORS zurückgeführt (E. Rubin und Z. Rasheed, persönliche Mitteilungen). Unsere Untersuchungen der α TRPS1-Präzipitate von T48D-Extrakten detektierten nur das im Bereich des potentiell SUMOylierten TOPORS migrierende Signal (Abb. 3.19F, Pfeil a). Dieses Ergebnis würde bedeuten, dass die Interaktion von TRPS1 ausschließlich mit der SUMOylierten Form von TOPORS erfolgt.

Da die kalkulierte molekulare Masse (ca. 142 kDa) von der in SDS-PAGE Analysen detektierten Größe des TRPS1 Proteins (ca. 165 kDa) abweicht, wurde durch weitere Analysen eine mögliche SUMOylierung von TRPS1 untersucht. Die Verwendung eines α SUMO Antikörpers in Western-Blot Analysen von T48D- oder Fibroblasten-Extrakten zeigten ein deutliches Signal im Bereich des TRPS1 Proteins (Abb. 3.25B), welches auch in α TRPS1 Präzipitaten dieser Extrakte detektiert werden konnte (Abb. 3.25C). Eine Analyse der Primärstruktur von TRPS1 offenbarte sieben potentielle SUMO-Zielsequenzen (ψ KXE), von denen alle sieben in den Sequenzen des Trps1 Proteins (Maus) bzw. fünf im XTrps1 (Krallenfrosch) gefunden wurden. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von E. Rubin sind *in vitro* Analysen einer TOPORS-abhängigen SUMOylierung von TRPS1 geplant.

Die stetig anwachsende Anzahl bekannter SUMOylierter Proteine führte zur Identifizierung diverser Funktionen dieser Art der post-translationalen Modifizierung.

1) Beispielsweise erfolgt die Regulation der Lokalisation des Proteins RanGAP1, dessen Funktion essentiell für den Transport von Proteinen durch die NPCs ist, durch SUMOylierung (Matunis *et al.*, 1996; Mahajan *et al.*, 1997). Nur das SUMOylierte RanGAP1 interagiert mit RanBP2 an den zytoplasmatischen Fibrillen der NPCs. Eine SUMO-defiziente Mutante von RanGAP1 kann nicht mehr mit RanBP2 interagieren und akkumuliert im Zytoplasma.

2) Die SUMOylierung kann als Antagonist der Ubiquitinierung fungieren. Z.B. verhindert die SUMOylierung der Ubiquitin-E3-Ligase Mdm2 eine Selbst-Ubiquitinierung und anschließende Degradation über das Proteasom (Buschmann *et al.*, 2000). Diese Stabilisierung von Mdm2 führt zu einer verstärkten Ubiquitinierung und Degradation von p53. Eine Beschädigung der DNA (z.B. durch UV-Strahlung) resultiert in einer Zunahme der p53-Stabilität und einem Stillstand des Zell-Zyklus oder einer Induktion der Apoptose (Oren, 1999). Dieser Anstieg der p53 Konzentration wird durch eine Degradation der de-SUMOylierten und anschließend ubiquitinierten Mdm2 E3-Ligase erklärt.

3) Die bisherigen Untersuchungen zur Analyse subnukleärer Strukturen geben Grund zur Annahme, dass die SUMOylierung eine Schlüsselrolle bei der Bildung spezifischer Strukturen innerhalb des Zellkerns spielt (Kim *et al.*, 2002). Z.B. bewirken Mutationen der SUMOylierungs-Sequenzen innerhalb des PML Proteins einen vollständigen Verlust der PML-Kernkörperchen, wobei das nicht-SUMOylierte PML ausschließlich im löslichen Kernplasma nachgewiesen werden konnte (Boddy *et al.*, 1996; Sternsdorf *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die SUMOylierungen von HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*) und TEL zur Bildung einer weiteren intranukleären Struktur führen, die sich von den PML-Kernkörperchen unterscheidet (Kim *et al.*, 1999; Chakrabarti *et al.*, 2000).

Kürzlich konnte erneut ein Bezug zwischen der SUMOylierung und einer bereits beschriebenen intranukleären Struktur, den *Polycomp-Group* (PcG)-Kernkörpern, hergestellt werden (Kagey *et al.*, 2003). Bei dieser Art von Kernkörperchen handelt es sich um eine Art epigenetische Markierung des Chromatins, die eine dauerhafte Inaktivierung der jeweilig markierten Region bewirkt (Cavalli und Paro, 1998). Bei den PcG Proteinen handelt es sich um funktionell verwandte Proteine die miteinander interagieren und so die PcG-Kernkörper bilden (Pirrotta, 1998; Sewalt *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 2001; Gunster *et al.*, 2001). Kagey *et al.* (2003) konnten zeigen, dass das Polycomb Protein Pc2 innerhalb der PcG-Kernkörper als E3-SUMO-Ligase die SUMOylierung des Transkriptions(co-)repressors CtBP (Carboxy-Terminus-bindendes Protein) katalysiert. Die Autoren spekulierten auf eine Funktion der PcG-Kernkörper als eine Art SUMOylierungs-Zentrum des Zellkerns. CtBP könnte dabei, durch seine Interaktionen mit einer Vielzahl bekannter Transkriptionsfaktoren, als eine Art Substrat zur Rekrutierung von Zielproteinen agieren (Kagey *et al.*, 2003). Darüber hinaus spekulieren die Autoren, ob die SUMOylierung von Pc2 und weiteren PcG Proteinen essentiell für die Bildung der PcG-Kernkörper ist.

4) Eine weitere Funktion der SUMOylierung ist die Modulation der Transkription. Z.B. interagiert das SUMOylierte PML mit dem Transkriptionsrepressor Daxx. Daxx wird dadurch in den PML-Kernkörperchen gebunden und inaktiviert (Ishov *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2000; Lehembre *et al.*, 2001). Die SUMOylierung des Transkriptionsfaktors LEF1 bewirkt ebenfalls eine Assoziation mit den PML-Kernkörperchen, die zu einer Inaktivierung von LEF1 führt (Sachdev *et al.*, 2001). Man findet aber auch nicht mit den PML-Strukturen assoziierte Transkriptionsrepressoren die über eine SUMOylierung deaktiviert werden (z.B. Sp3, Sapetschnig *et al.*, 2002). Neben einer Deaktivierung kann die SUMO-Modifizierung eines Transkriptionsfaktors auch eine Aktivitätszunahme induzieren (z.B. HSF1, Hong *et al.*, 2001).

4.3 Die Interaktionspartner des TRPS1 Transkriptionsfaktors

Durch die Verwendung einer cDNA Bibliothek, die aus Geweben embryonaler Mäuse generiert wurde, konnten sieben Bindepartner des Trps1 Transkriptionsfaktors identifiziert werden. Die Expression von *TRPS1/Trps1* konnte allerdings nicht nur in embryonalen sondern auch in Geweben adulter Organismen nachgewiesen werden (Momeni *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2000; Malik *et al.*, 2001). Es ist deshalb anzunehmen, dass die hier aufgeführten Bindepartner nicht das ganze Spektrum der möglichen TRPS1 Interaktionen abdecken. So konnte beispielsweise in keinem der hier identifizierten Klone ein für TRPS1 kodierendes DNA Fragment nachgewiesen werden, obwohl Interaktionsstudien des IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfingers eine Homodimerisierung aufzeigten (McCarty *et al.*, 2003). Dass diese Homodimerisierung des Doppelzinkfinger-Motivs (TRPS1 Zf 8 + 9) auch in weiteren Hefe Systemen nicht verifiziert werden konnte ist möglicherweise auf die unterschiedlichen experimentellen Verfahren oder die unterschiedlichen Zell-Systeme zurückzuführen.

Obwohl der N-terminale Teil von Trps1 mehrere potentielle Protein-bindende Regionen enthält, konnte in dieser Region bisher nur ein Bindepartner identifiziert werden. Es ist hierbei anzumerken, dass in den durchgeführten Experimenten eine Vielzahl weiterer langsam wachsender Hefe-Klone gefunden wurde, deren Charakterisierung noch aussteht.

Die mit dem C-terminalen Trps1 Fragment identifizierten Bindepartner repräsentieren einen Querschnitt unterschiedlicher Faktoren zur Modulation der Funktionen von TRPS1. So zeigen bestimmte in den TRP Syndromen betroffene Gewebe bereits in der frühen Embryonalentwicklung die Expression von *Punc* und *Arkadia* (Salbaum, 1998; Episkopou *et al.*, 2001; Niederländer *et al.*, 2001). Hybridisierungs-Experimente in Mäuse-Embryonen wiesen in diesen Geweben auch die Expression von *Trps1* nach (Malik *et al.*, 2001; Kunath *et al.*, 2002). Eine gemeinsame Funktion der aufgezählten Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Darüber hinaus konnten mit LC8a und RNF4 zwei Bindepartner identifiziert werden die einen modulierenden Einfluss auf die TRPS1-vermittelte Repression hatten. Auch das Poly(rC)bindende Protein PCBP1 könnte ein weiterer Bindepartner zur Modifizierung der transkriptionellen Funktion von TRPS1 sein.

Die Proteine A1Up und TOPORS spielen eine Rolle in der Ubiquitin-ähnlichen post-translationalen Modifizierung von Proteinen. Während derzeit über die Rolle des A1Up Proteins als Ubiquitin-Analogon spekuliert wird, konnte TOPORS als SUMO-E3-Ligase identifiziert werden (Davidson *et al.*, 2000; persönliche Mitteilung von E. Rubin).

Kürzlich postulierten Verger *et al.* (2003) eine mögliche SUMOylierung verschiedener Mitglieder der Familie der IKAROS-Transkriptionsfaktoren. Die Zielsequenzen dieser SUMO-Modifizierungen wurden in einem konservierten Teil der jeweiligen Proteine bestimmt, der eine hohe Homologie zum IKAROS-ähnlichen C-Terminus von TRPS1 zeigt. Darüber hinaus konnte auch der mit TRPS1 verwandte Transkriptionsrepressor SALL1 als Zielprotein einer Modifizierung durch SUMO beschrieben werden (Netzer *et al.*, 2002). Da die Bildung subnukleärer Strukturen oftmals über die SUMOylierung induziert wird, ist es interessant zu erwähnen, dass nicht nur TRPS1 sondern auch IKAROS und SALL1 innerhalb distinkter Strukturen des Zellkerns nachgewiesen wurden (Brown *et al.*, 1997; Netzer *et al.*, 2001). Bei den für IKAROS und SALL1 gezeigten Strukturen handelt es sich um Proteinkomplexe am Heterochromatin, die vermutlich die Deaktivierung spezifischer Gene bewirken (Kim *et al.*, 1999; Koipally *et al.*, 1999, Netzer *et al.*, 2001). TRPS1 konnte in zwei unterschiedlichen subnukleären Strukturen nachgewiesen werden. Während ein geringer Teil des endogenen TRPS1 in den PML-Kernkörperchen gezeigt wurde, lokalisiert der größte Teil von TRPS1 in rundlichen Strukturen deren Klassifizierung noch aussteht. Erste Vergleiche dieser Strukturen mit bisher bekannten Komplexen innerhalb des Zellkerns zeigten die größte Ähnlichkeit mit den PcG-Kernkörpern. Bereits geplante Co-Lokalisierungsstudien von TRPS1 mit unterschiedlichen Proteinen der Polycomb-Gruppe sollen zeigen, ob es sich bei diesen Strukturen tatsächlich um PcG-Kernkörper handelt. Eine Lokalisierung von TRPS1 innerhalb dieser Komplexe würde darauf hinweisen, dass TRPS1 nicht nur als „klassischer“ Transkriptionsrepressor die Expression spezifischer Ziel-Gene reguliert, sondern als Teil dieser aus multiplen Proteinen bestehenden PcG-Kernkörpern an der dauerhafte Inaktivierung bestimmter Gene beteiligt ist.

Diese und weitere geplante Experimente zu Analyse der transkriptionellen Funktion und der intrazellulären Verteilung SUMO-defizienter TRPS1 Mutanten, sowie die detaillierte Charakterisierung der bereits identifizierten und der evtl. noch unbekannten Interaktionspartner, können vielleicht zum Verständnis der molekularen Regulationsmechanismen des Transkriptionsfaktors TRPS1 beitragen.

5. Zusammenfassung

Das *TRPS1* Gen kodiert für einen Transkriptionsrepressor. Mutationen oder eine Deletion dieses Gens verursachen die Tricho-Rhino-Phalangealen Syndrome. Die hier vorliegende Arbeit beschreibt Analysen zur Charakterisierung des TRPS1 Proteins. Durch *in vitro* Rekonstruktionen spezifischer in Patienten mit TRPS identifizierten Mutationen, konnte nur ein von ursprünglich zwei vorhergesagten Kernlokalisierungssignalen als funktionell klassifiziert werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Identifizierung von TRPS1-Bindeproteinen. Durch die Verwendung von zwei überlappenden Trps1 Fragmenten konnten in einem Hefe Zwei-Hybrid System sieben potentielle Interaktionspartner gefunden werden. Der Einsatz unterschiedlicher Trps1 Fragmente in weiteren Hefe und biochemischen Systemen ermöglichte eine Eingrenzung der für diese Interaktionen erforderlichen Regionen auf unterschiedliche Bereiche innerhalb des Trps1 Proteins. In sich anschließenden immunchemischen Co-Präzipitierungen und Co-Lokalisierungsstudien konnten die Interaktionen der humanen Orthologe TRPS1 zu LC8a, RNF4 und TOPORS verifiziert werden. Mobilitätsshift Experimente zeigten, dass sowohl LC8a als auch RNF4 das Bindeverhalten von TRPS1 zur GATA-Konsensus-Sequenz verändern. Untersuchungen dieser Interaktionen in einem Luciferase-Reporter System ergaben, dass LC8a und RNF4 zu einer Reduktion bzw. Inhibition der TRPS1-vermittelten Repression in der GATA-abhängigen Transkription führten. Die SUMO-E3-Ligase TOPORS zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die transkriptionelle Funktion von TRPS1.

Durch die Verwendung eines α SUMO Antikörpers in Western-Blot Analysen konnte eine mögliche SUMOylierung von TRPS1 gezeigt werden. Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung zeigten das endogene TRPS1 in zwei distinkten subnukleären Strukturen. Durch TRPS1+PML Co-Lokalisierungsstudien konnte ein geringer Teil des endogenen TRPS1 innerhalb der PML-Kernkörperchen nachgewiesen werden, wobei die Charakterisierung der durch den größeren Anteil an TRPS1 gebildeten Strukturen noch aussteht.

Die hier vorgestellten Ergebnisse und weitere Analysen zur spezifischen subnukleären Verteilung und der noch nicht näher untersuchten TRPS1-Interaktionen, können vielleicht zum Verständnis der molekularen Mechanismen der TRP Syndrome beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Alonso, C., Miskin, J., Fernández-Zapatero, P., Hernáez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L. and Escribano, J.E. (2001) African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J. Virol.*, **75**, 9819-9827.
- Amling, M., Neff, L., Tanaka, S., Inoue, D., Kuida, K., Weir, E., Philbrick, W.M., Broadus, A.E., and Baron, R. (1997) Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J. Cell Biol.*, **136**, 205-213
- Ashkenas, J. and Byers, P.H. (1997) The final stage of gene expression: chaperones and the regulation of protein fate. *Am. J. Hum. Genet.*, **61**, 267-272.
- Ausubel, F.M, B. R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*: Wiley Interscience.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques*, **14**, 920-924.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L. and Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, **61**, 49-59.
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E. and Freemont, P.S. (1996) PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene*, **13**, 971-982.
- Boulikas, T. (1993) Nuclear localization signals (NLS). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **3**, 193-227.
- Boulikas, T. (1994) A compilation and classification of DNA binding sites for protein transcription factors from vertebrates. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **4**, 117-321.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brown, K.E., Guest, S.S., Smale, S.T., Hahm, K., Merckenschlager, M. and Fisher, A.G. (1997) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*, **91**, 845-854.
- Bühler, E.M. and Malik, N.J. (1984) The Tricho-rhino-phalangel syndrome (s): chromosom 8 long arm deletion: is there a shortest region of overlap between reported cases? TRP I and TRP II syndromes: are they separate entities? *Am. J. Med. Genet.*, **19**, 113-119.

- Burley, S.K. and Roeder, R.G. (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 769-799.
- Buschmann, T., Fuchs, S.Y., Lee, C.G., Pan, Z.Q. and Ronai, Z. (2000) SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell*, **101**, 753-762.
- Britten, R.J. and Davidson, E.H. (1969) Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, **165**, 349-357.
- Cavalli, G. and Paro, R. (1998) Chromo-domain proteins: linking chromatin structure to epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **10**, 354-360.
- Chang, G.T., Blok, L.J., Steenbeek, M., Veldscholte, J., van Weerden, W.M., van Steenbrugge G.J. and Brinkmann, A.O. (1997) Differentially expressed genes in androgen-dependent and -independent prostate carcinomas. *Cancer Res.*, **57**, 4075-4081.
- Chang, G.T., Steenbeek, M., Schippers, E., Blok, L.J., van Weerden, W.M., van Alewijk, D.C., Eussen, B.H., van Steenbrugge, G.J. and Brinkmann, A.O. (2000) Characterization of a zinc-finger protein and its association with apoptosis in prostate cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 1414-1421.
- Chang, G.T., van den Bemd, G.J., Jhamai, M. and Brinkmann, A.O. (2002) Structure and function of GC79/TRPS1, a novel androgen-repressible apoptosis gene. *Apoptosis*, **7**, 13-21.
- Chakrabarti, S.R., Sood, R., Nandi, S. and Nucifora, G. (2000) Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 13281-13285.
- Chiaritoti, L., Benvenuto, G., Fedele, M., Santoro, M., Simeone, A., Fusco, A. and Bruni, C.B. (1998) Identification and characterization of a novel RING-finger gene (RNF4) mapping at 4p16.3. *Genomics*, **47**, 258-65.
- Clausen, T., Southan, C. and Ehrmann M. (2002) The HtrA family of proteases: Implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell*, **10**, 443-455.
- Cokol, M., Nair, R. and Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.*, **1**, 411-415.
- Crépieux, P., Kwon, H., Leclerc, N., Spencer, W., Richard, S., Lin, R. and Hiscott, J. (1997) I κ B α physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 7375-7385.
- Davidson, J.D., Riley, B., Burright, E.N., Duvick, L.A., Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (2000) Identification and characterization of an ataxin-1-interacting protein: A1Up, a ubiquitin-like nuclear protein. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2305-2312.

- Denisenko, O.N., O'Neill, B., Ostrowski, J., Van Seuning, I. and Bomsztyk, K. (1996) Zik1, a transcriptional repressor that interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle K protein. *J. Biol. Chem.*, **271**, 27701-27706.
- Denisenko, O.N. and Bomsztyk, K. (1997) The product of the murine homolog of the *Drosophila extra sex combs* gene displays transcriptional repressor activity. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 4707-4717.
- Dick, T., Ray, K., Salz, H.K. and Chia, W. (1996) Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1966-1977.
- Episkopou, V., Arkell, R., Timmons, P.M., Walsh, J.J., Andrew, R.L. and Swan, D. (2001) Induction of the mammalian node requires Arkadia function in the extraembryonic lineages. *Nature*, **410**, 825-830.
- Epstein, E., Sela-Brown, A., Ringel, I., Kilav, R., King, S.M., Benashski, S.E., Yisraeli, J.K., Silver, J. and Naveh-Manny, T. (2000) Dynein light chain binding to a 3'-untranslated sequence mediates parathyroid hormone mRNA association with microtubules. *J. Clin. Invest.*, **105**, 505-512.
- Espindola, F.S., Suter, D.M., Partata, L.B.E., Cao, T., Wolenski, J.S., Cheney, R.E., King, S.M. and Mooseker, M.S. (2000) The light chain composition of brain myosin-Va: Calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **47**, 269-281.
- Fan, J., Zhang, Q., Tochio, H., Li, M. and Zhang, M. (2001) Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain. *J. Mol. Biol.*, **306**, 97-108.
- Fedele, M., Benvenuto, G., Pero, R., Macello, B., Battista, S., Lembo, F., VolloSno, E., Day, P.M., Santoro, M., Lania, L., Bruni, C.B., Fusco, A. and Chiaritoti, L. (2000) A novel member of the BTB/POZ family, PATZ, associates with the RNF4 RING finger protein and acts as a transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7894-7901.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Francis, N.J., Saurin, A.J., Shao, Z. and Kingston, R.E. (2001) Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol. Cell*, **8**, 545-556.
- Galili, N., Nayak, S., Epstein, J.A. and Buck C.A. (2000) Rnf4, a RING protein expressed in the developing nervous and reproductive systems, interacts with Gscl, a gene within the DiGeorge critical region. *Dev. Dyn.*, **218**, 102-111.
- Giedion, A. (1966) Das Tricho-rhino-phalangeale Syndrom. *Helv. Paediatr. Acta*, **21**, 475-485.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A. and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells *Nucleic. Acids. Res.*, **20**, 1425.

- Gill, G. and Ptashne, M. (1987) Mutants of GAL4 protein altered in an activation function. *Cell*, **51**, 121-126.
- Gunster, M.J., Raaphorst, F.M., Hamer, K.M., den Blaauwen, J.L., Fieret, E., Meijer, C.J. and Otte, A.P. (2001) Differential expression of human Polycomb group proteins in various tissues and cell types. *J. Cell. Biochem.*, **81**, 129-143.
- Hall, B.D., Langer, L.O., Giedion, A., Smith, D.W., Cohen, M.M. Jr., Beals, R.K. and Brandner, M. (1974) Langer-Giedion syndrome. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.*, **10**, 147-164.
- Haluska, P. Jr., Saleem, A., Rasheed, Z., Ahmed, F., Su, E.W., Liu, L.F. and Rubin, E.H. (1999) Interaction between human topoisomerase I and a novel RING finger/arginine-serine protein. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2538-2544.
- Hanna-Rose, W. and Hansen, U. (1996) Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors. *Trends Genet.*, **12**, 229-234.
- Herschbach, B.M. and Johnson, A.D. (1993) Transcriptional repression in eukaryotes. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **9**, 479-509.
- Herzig, R.P., Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2000) Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and drosophila. *J. Cell. Sci.*, **113**, 4263-4273.
- Hilton, M.J., Sawyer, J.M., Gutierrez, L., Hogart, A., Kung, T.C. and Wells, D.E. (2002) Analysis of novel and recurrent mutations responsible for the tricho-rhino-phalangeal syndromes. *J. Hum. Genet.*, **47**, 103-106.
- Hollenberg, S.M., Sternglanz, R., Cheng, P.F. and Weintraub, H. (1995) Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3813-3822.
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., Sarge, K.D. and Goodson, M. (2001) Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40263-40267. Erratum in: *J. Biol. Chem.*, **277**, 26708.
- Hope, I.A., Mahadevan, S. and Struhl, K. (1988) Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature*, **333**, 635-340.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F. 3rd and Maul G.G. (1999) PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell. Biol.*, **147**, 221-234.
- Itin, P.H., Bohn, S., Mathys, D., Guggenheim, R., Richard, G. (1996) Trichorhinophalangeal syndrome type III. *Dermatology*, **4**, 349-352

- Jacob, Y., Badrane, H., Ceccaldi, P.-E., and Tordo, N. (2000) Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J. Virol.* **74**, 10217–10222.
- Jaffrey, S.R. and Snyder, S.H. (1996) PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science*, **274**, 774-777.
- Johnson, E.S. and Blobel, G. (1997) Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J. Biol. Chem.*, **272**, 26799-26802.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A., Wotton, D. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*, **113**, 127-137.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. and Georgopoulos, K. (1999a) Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*, **10**, 345-355.
- Kim, Y.H., Choi, C.Y. and Kim, Y. (1999b) Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 12350-12355.
- Kim, K.I., Baek, S.H. and Chung, C.H. (2002) Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J. Cell. Physiol.*, **191**, 257-268.
- King, S.M., Barbarese, E., Dillman, J.F. III., Patel-King, R.S., Carson, J.H. and Pfister, K.K. (1996) Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19358-19366.
- Kobayashi, H., Hino, M., Shimodahira, M., Iwakura, T., Ishihara, T., Ikekubo, K., Ogawa, Y., Nakao, K. and Kurahachi, H. (2002) Missense mutation of TRPS1 in a family of tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. *Am. J. med. Genet.*, **107**, 26-29.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J. and Georgopoulos, K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J.*, **18**, 3090-3100.
- Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F. and de The, H. (1995) The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene*, **10**, 1315-1324.
- Kunath, M., Ludecke, H-J. and Vortkamp, A. (2002) Expression of Trps1 during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns*, **2**, 119-122.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langer, L.O. (1969) The thoraco-pelvic-phalageal dystrophy. Clinical delineation of birth defects. Part IV. Skeletal dysplasia. *Birth Defects*, **IV**, 55-64

- Latchman, D.S. (1990) Eukaryotic transcription factors. *Biochem J.*, **270**, 281-289.
- Lehembre, F., Müller, S., Pandolfi, P.P. and Dejean, A. (2001) Regulation of Pax3 transcriptional activity by SUMO-1-modified PML. *Oncogene*, **20**, 1-9.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J. and Chen, J.D. (2000) Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1784-1796.
- Lüdecke, H-J., Schaper, J., Meinecke, P., Momeni, P., Gross, S., von Holtum, D., Hirche, H., Abramowicz, M.J., Albrecht, B., Apacik, C., Christen, H.J., Claussen, U., Devriendt, K., Fastnacht, E., Forderer, A., Friedrich, U., Goodship, T.H., Greiwe, M., Hamm, H., Hennekam, R.C., Hinkel, G.K., Hoeltzenbein, M., Kayserili, H., Majewski, F., Mathieu, M., McLeod, R., Midro, A.T., Moog, U., Nagai, T., Niikawa, N., Orstavik, K.H., Plochl, E., Seitz, C., Schmidtke, J., Tranebjaerg, L., Tsukahara, M., Wittwer, B., Zabel, B., Gillesen-Kaesbach, G. and Horsthemke B. (2001) Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 81-91.
- Luo, Y., Ge, H., Stevens, S., Xiao, H. and Roeder, R.G. (1998) Coactivation by OCA-B: definition of critical regions and synergism with general cofactors. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3803-3810.
- Lyngsø, C., Bouteiller, G., Damgaard, C.K., Ryom, D., Sanchez-Munoz, S., Norby, P.L., Bonven, B.J. and Jorgensen, P. (2000) Interaction between the transcription factor SPBP and the positive cofactor RNF4. An interplay between protein binding zinc fingers. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26144-26149.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, **88**, 97-107.
- Makokha, M. Hare, M., Li, M., Hays, T., and Barbar, E. (2002) Interactions of cytoplasmic dynein light chains Tctex-1 and LC8 with the intermediate chain IC74. *Biochemistry*, **41**, 4302-4311.
- Makeyev, A.V., Ckheidzw, A.N. and Liebhaver, S.A. (1999) A set of highly conserved RNA-binding proteins, CP-1 and CP2, implicated in mRNA stabilization, are coexpressed from an intronless gene and its Intron-containing paralog. *J. Biol. Chem.*, **274**, 24849-24857
- Makeyev, A.V. and Liebhaver, S.A. (2002) The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*, **8**, 265-278.
- Malik, T.H., Shoichet, S.A., Latham, P., Kroll, T.G., Peters, L.L. and Shivdasani, R.A. (2001) Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1. *EMBO J.*, **20**, 1715-1725.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook J. F. E. F. (1982) Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.

- Margolin, W. (2000) Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells. *Methods.*, **20**, 62-72.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.*, **135**, 1457-1470.
- McCarty, A.S., Kleiger, G., Eisenberg, D. and Smale, S.T (2003) Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol. Cell*, **11**, 459-470.
- Meissner, W., Rothfels, H., Schafer, B. and Seifart, K. (2001) Development of an inducible pol III transcription system essentially requiring a mutated form of the TATA-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1672-1682.
- Michelotti, E.F., Michelotti, G.A., Aronsohn, A.I. and Levens, D. (1996) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2350-2360.
- Moilanen, A.M., Poukka, H., Karvonen, U., Hakli, M., Janne, O.A. and Palvimo, J.J. (1998) Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5128-5139.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. and Levine, A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, **69**, 1237-1245.
- Momeni, P., Glockner, G., Schmidt, O., von Holtum, D., Albrecht, B., Gillessen-Kaesbach, G., Hennekam, R., Meinecke, P., Zabel, B., Rosenthal, A., Horsthemke, B. and Lüdecke, H-J. (2000) Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nat. Genet.*, **24**, 71-74.
- Müller, S., Matunis, M.J. and Dejean, A. (1998) Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.*, **17**, 61-70.
- Müller-Röver, S., Rossiter, H., Lindner, G., Peters, E.M.J., Kupper, T.S. and Paus, R., (1999) Hair follicle apoptosis and Bcl-2. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**, 272-277.
- Müller, S., Berger, M., Lehenbre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y. and Dejean, A. (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.*, **275**, 13321-13329.
- Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G. and Thanos, D. (1998) Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol. Cell*, **2**, 457-467.

- Nagai, T., Nishimura, G., Kasai, H., Hasegawa, T., Kato, R., Ohashi, H. and Fukushima, Y. (1994) Another family with Tricho-rhino-phalageal syndrome type III (Sugio-Kajii syndrome). *Am. J. Med. Genet.*, **49**, 279-280.
- Netzer, C., Rieger, L., Brero, A., Zhang, C.D., Hinzke, M., Kohlhase and J., Bohlander, S.K. (2001) SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, encodes a transcriptional repressor which interacts with TRF1/PIN2 and localizes to pericentromeric heterochromatin. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 3017-3024.
- Netzer, C., Bohlander, S.K., Rieger, L., Muller, S. and Kohlhase, J. (2002) Interaction of the developmental regulator SALL1 with UBE2I and SUMO-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 870-876.
- Niederländer, C., Walsh, J.J., Episkopou, V. and Jones, C.M. (2001) Arkadia enhances nodal-related signalling to induce mesendoderm. *Nature*, **410**, 830-834.
- Niikawa, N. and Kamei, T. (1986) The Sugio-Kajii syndrome, proposed tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. *Am. J. Med. Genet.*, **24**, 759-760.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2000. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- Oren, M. (1999) Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 36031-36034.
- Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.*, **10**, 2657-2683.
- Pirrotta, V. (1998) Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell*, **93**, 333-336.
- Poisson, N., Real, E., Gaudin, Y., Vaney, M.C., King, S., Jakob, Y., Tordo, N. and Blondel, D. (2001) Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2691-2696.
- Poukka, H., Aarnisalo, P., Santti, H., Janne, O.A. and Palvimo, J.J. (2000) Coregulator small nuclear RING finger protein (SNURF) enhances Sp1- and steroid receptor-mediated transcription by different mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **275**, 571-579.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. and Strasser, A. (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell.*, **3**, 287-296.
- Rasheed, Z.A., Saleem, A., Ravee, Y., Pandolfi, P.P. and Rubin, E.H. (2002) The topoisomerase I-binding RING protein, topors, is associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Exp. Cell. Res.*, **277**, 152-160.

- Raux, H., Flamand, A., and Blondel, D. (2000) Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *J. Virol.*, **74**, 10212-10216.
- Rodríguez-Crespo, I., Yélamos, B., Roncal, F., Albar, J.P., Ortiz de Montellano, P.R. and Gavilanes, F. (2001) Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique. *FEBS Letters*, **503**, 135-141.
- Rout, M.P. and Blobel, G. (1993) Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.*, **123**, 771-783.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. and Grosschedl, R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.*, **15**, 3088-3103.
- Salbaum, J.M. (1998) Punc, a novel mouse gene of the immunoglobulin superfamily, is expressed predominantly in the developing nervous system. *Mech. Dev.*, **71**, 201-204.
- Sambrook, J. F. E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Sampson, D.A., Wang, M. and Matunis, M.J. (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.*, **276**, 21664-21669.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F. and Suske, G. (2002) Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J.*, **21**, 5206-5215.
- Sauer, F. and Jackle, H. (1993) Dimerization and the control of transcription by Krüppel. *Nature*, **364**, 454-457.
- Sewalt, R.G., van der Vlag, J., Gunster, M.J., Hamer, K.M., den Blaauwen, J.L., Satijn, D.P., Hendrix, T., van Driel, R. and Otte, A.P. (1998) Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3586-95.
- Shoichet, S.A., Malik, T.H., Rothman, J.H. and Shivdasani, R.A. (2000) Action of the *Caenorhabditis elegans* GATA factor END-1 in *Xenopus* suggests that similar mechanisms initiate endoderm development in ecdysozoa and vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 4076-81
- Sugio, Y. and Kajii, T. (1984) Ruvalcaba syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am. J. Med. Genet.*, **19**, 741-753.
- Sun, L., Liu, A. and Georgopoulos, K. (1996) Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.*, **15**, 5358-5369.

- Triezenberg, S.J. (1995) Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 190-196. '
- Van den Bemd G.J., Jhamai M., Staal A., van Wijnen A.J., Lian J.B., Stein G.S., Pols H.A.P. and van Leeuwen J.P.T.M. (2002) A central dinucleotide within vitamin D response elements modulates DNA binding and transactivation by the vitamin D receptor in cellular response to natural and synthetic ligands. *J. Biol. Chem.*, **277**, 14539-14546.
- Verger, A., Perdomo, J. and Crossley, M. (2003) Modification with SUMO. *EMBO Rep.*, **4**, 137-142.
- Vilain, C., Sznajder, Y., Rypens, F., Desir, D. and Abramowicz, M.J. (1999) Sporadic case of trichorhinophalangeal syndrome type III in a European patient. *Am. J. Med. Genet.*, **85**, 495-497.
- Wade, P.A. and Jaehning, J.A. (1996) Transcriptional corepression in vitro: a Mot1p-associated form of TATA-binding protein is required for repression by Leu3p. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1641-1648.
- Wang, Z.G., Delva, L., Gasoli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F. and Pandolci, P.P. (1998) Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science*, **279**, 1547-1551.
- Wilson, M.J., Salata, M.W., Susalka, S.J. and Pfister, K.K. (2001) Light chains of mammalian cytoplasmic dynein: Identification and characterization of a family of LC8 light chains. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **49**, 229-240.
- Yang, W., Li, C. and Mansour, S.L. (2001) Impaired motor coordination in mice that lack punc. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 6031-6043.
- Yu, J., Yu, L., Chen, Z., Zheng, L., Chen, X., Wang, X., Ren, D. and Zhao, S. (2002) Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase interacts with protein kinase A inhibitors. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **99**, 145-149.
- Zhong, S., Müller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A. and Pandolfi, P.P. (2000) Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood*, **95**, 2748-2752.
- Zhou, R., Wen, H. and Ao, S.Z. (1999) Identification of a novel gene encoding a p53-associated protein. *Gene*, **235**, 93-101.

7. Anhang

Oligonukleotide (Primer)

Wenn nicht anders gekennzeichnet, markieren die unterstrichenen Regionen die Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Fettgedruckte ATGs markieren Startcodons.

Trps1 Fragmente für Insertion in p414M25lexN0 und pcDNA3 (T7 Promoter)

Fragment F4

5'-CGGGATCCATAT**T**GGTCCGGAAAAAGCACC-3'
 5'-CGGAATTCGGTTATAAAATCGCATTTGG-3'

Fragment F5

5'-CATGGATCCGACCGTGCATGAGTCCCAAG-3'
 5'-CAAGCTATTGAATTC**C**CCATCAAGAAAACC-3'

Fragment F6

5'-CATGGATCCGACCGTGCATGAGTCC-3'
 5'-CGGAATTC**T**TTCTCCTTGGAGGC-3'

Fragment F9

5'-CATGGATCCGACCGTGCATGAGTCC-3'
 5'-CGGAATTC**T**GAACCTCCTCTTAAGG-3'

Fragment F10

5'-CATGGATCCGACCGTGCATGAGTCC-3'
 5'-CGGAATTC**G**CTGGACACAGGCG-3'

Fragment F13

5'-GCGGATCCGCTAATGGCGAAGAGG-3'
 5'-CGGAATTCGGAGGCACCATTTC-3'

Fragment F1

5'-CATGGATCC**A**AGGAGAAAACCAAGG-3'
 5'-CAAGCTATTGAATTC**C**CCATCAAGAAAACC-3'

Primer zur Amplifizierung der kodierenden Regionen der identifizierten Bindepartner (im VP16 Plasmid) und anschließender Insertion in p415GALNVP0 oder pGEX-4T2

VP16 Primer

5'-GTGGATCCGGGTACCGAGCTCAATTCC
 5'-GCCGCTCGAGGCCAGTGAATTCGAGCTTC

Primer zur Amplifikation der jeweiligen cDNAs und anschließender Insertion in die Plasmide pEGFP-N3 und pFlag-N3

TRPS1

5'-CGGAATTCACAGATATGGTCCGG-3'

5'-CGGGATCCATACTCTTTAGGTTTCC-3'

RNF4

5'-CCCAAGCTTACAATGAGTACAAGAAAGCG-3'

5'-CGGGATCCCTATATAAATGGGGTGGTAC-3'

LC8a

5'-CCCAAGCTTACCATGTGCGACCGAAAGGC-3'

5'-CGGGATCCACCAGATTTGAACAGAAG-3'

TOPORS

5'-CCCAAGCTTTTTCATGGGGTCGCAGCCGCCG-3'

5'-CGGAATTCGACATATCACAGTCTTTACC-3'

GATA-Oligonukleotid für EMSA Experimente

Der unterstrichene Bereich markiert hier die GATA-Konsensus-Sequenz.

5'-GGCGAAGTGATAAGGGGAGGCGCC-3'

Primer für *in vitro* Mutagenese Experimente

Die jeweils substituierten Basen sind unterstrichen.

2854C>T

5'-CAAGAAAGTGCCTTAACCCAG-3'

5'-CTGGGTAAAGGCACTTTCTTG-3'

2855G>A

5'-CTGGGTAAAGGTGCTTTCTTG-3'

5'-CAAGAAAGCACCTTAACCCAG-3'

ΔExon6

5'-CCGTAACAGGGACTGGGATTC-3'

5'-ACTCCCAGGCCTTTAAACCATC-3'

Primer für die Sequenzierung von *TRPS1*

Exon 2

PM125 5'-GCTCCAGATTTGCTCATGC-3'

PM126 5'-AAACTCCCCTAGCGAGTCGT-3'

Exon 3

PM120 5'-TTTTTCCTAGAGGAAGCATTTGA-3'

PM119 5'-TTGAAGCCAGCCTTCTCACT-3'

PM118 5'-GAACTAAATCATAAGGAGGAACAT-3'

PM117 5'-CTTGCCCTGTTTCCTCTGTA-3'

PM109 5'-AAGAGCAGAGGCAGATGACC-3'

PM108 5'-CTGTCCAGCTCAGCATCTTG-3'

PM89 5'-CCTTCAGATGGGGGTGTAAG-3'

PM88 5'-TGGTACTGGGACCTTGGTTT-3'

Exon 4

PM139 5'-GCAGAGGGCCCATTGAATTA-3'

PM140 5'-GGCACTGAGTACCCAACAGG-3'

PM102 5'-GCAACTCATCCACCGAATTA-3'

PM103 5'-TTAATGACAGAGCCCCTGGA-3'

PM104 5'-GAACATTATGGCAAGCAGCA-3'

PM105 5'-TCTCCAAGGTGCTTTCTGG-3'

PM106 5'-GACAGACAAGAGCTCGAGTGG-3'

PM107 5'-TGTTTGACATCCGATGCTTG-3'

PM101 5'-GAAGCTCGCGAGTCAAACAT-3'

PM100 5'-AACTTCCCCAAGTCATTGGAA-3'

Exon 5

PM80 5'-CCCTTCAGAACGCTGTCTTT-3'

PM81 5'-GCCTCCACATTGGGACTATC-3'

PM87 5'-GTGATGACCTTCGCAATGTG-3'

PM86 5'-CCTTTTGCCCTTCAAAACAA-3'

Exon 6

PM65 5'-CATGTGACTCACCTCTGACCT-3'

PM64 5'-CATAAATCACATGTGCACTCAA-3'

Exon 7

PM70 5'-CTTAAGCATGGTTTATATTTGTGA-3'

PM71 5'-CCTGAGGACTTTTTATCTGAATGT-3'

PM76 5'-CCAGCCTAAGTAAATACGA-3'

PM77 5'-CCTTCGTTTTCTCCTTGGA-3'

PM67 5'-GCCTTATCCCACCTTCAAT-3'

PM66 5'-CTCATCAAAAGAAAGAATAACAAA-3'

Danke

Herrn Dr. Hermann-Josef Lüdecke danke ich für das freundschaftliche Miteinander, seine wissenschaftliche Betreuung und tatkräftige Unterstützungen beim Verfassen und der Strukturierung von *Abstracts*, Publikationen usw.

Herrn Prof. Dr. Horsthemke danke ich für die Überlassung dieses sehr interessanten und spannenden Themas, seine wissenschaftliche Betreuung, seiner Unterstützung bei der Realisierung meiner Ideen und seine Art mich für die Wissenschaft begeistern zu können.

Herrn Dr. Kamiab Tavassoli (Mister T) danke ich für die Einführung in zahlreiche zellbiologische Methoden und seine immer anhaltende gute Laune, die der Arbeit immer wieder Spaß verliehen hat!

Frau Paola Brega danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die mehr als gute Atmosphäre in unserem gemeinsamen Labor und die Erweiterung meines italienischen Wortschatzes ;o).

Herrn Prof. Tarik Möröy danke ich für die Möglichkeit in seinem Institut einen großen Teil meiner Experimente durchführen zu können und seine wissenschaftliche Unterstützung.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe IV (Instituts für Zellbiologie und Tumorforschung) für die freundliche Integration in die Gruppe und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen bedanken!

Herrn Dr. Glenn T. Chang und Dr. Gert-Jan van den Bemd (Department of Reproduction and Development, Erasmus Medical Center in Rotterdam, Niederlande) danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung der EMSA Experimente und für zahlreiche Antikörper bzw. Antiseren.

Frau Prof. Dr. med. Gabriele Gillessen-Kaesbach (meiner Lieblings-Professorin) danke ich für die Hilfe bei medizinischen Fragestellungen und ihr großes Interesse an meiner Arbeit.

Stephanie Groß und Diana von Holtum danke ich für die Sequenzierungen meiner zahlreichen Klone und ganz besonders Stephanie für die nicht mehr zählbaren Mini- und Maxi-Präparationen.

Conni Korn und Regina Kubica danke ich für die Kultivierung der nativen Fibroblasten und ihr Interesse an dem „was passiert jetzt damit?“.

Herrn Prof. Dr. Eric Rubin und Dr. Zeshaan Rasheed (Department of Pharmacology und Medicine in New Jersey, USA) danke ich für das α TOPORS Antiserum und den Informationsaustausch zum Thema TOPORS.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik (Dr. Beate Albrecht, Birgit Ansperger, Dr. Stefan Böhringer, Dr. Karin Buiting, Sven Fischer, Martina Fleuringer, Susanne Frank, Sandrine Gratias, Thomas Häusler, Jasmin Hefendehl, Barbara Henke, Elke Jürgens, Sabine Kaya-Westerloh, Rosa Kranefeld, Christina Lich, Prof.Dr. med. Dietmar Lohmann, Lars Maßhöfer, Claudia Mertel, Hülya Nazlican, Dr. Eva-Christina Prott, Maren Runte, Hildegard Solka, Melanie Trommler, Dr. med. Dagmar Wieczorek, Dr. Michael Zeschnigk), die alle ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben und durch ihre Kollegialität den Spaß an der Arbeit nicht in Vergessenheit geraten ließen!

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie.

Meiner Freundin Janette und meiner Tochter Anna Lena dafür, dass sie mich ständig neu motiviert haben und für Ihr aufgebrachtes Verständnis für meine zeitaufwendige Arbeit.

Meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und mir die Möglichkeit gaben diese Arbeit bei ihnen verfassen zu können.

Lebenslauf

Name: Frank Kaiser
Geburtsdatum: 23.08.1973
Geburtsort: Wuppertal
Staatsangehörigkeit: deutsch
Tochter: Anna Lena Grüne (geb. am 19.02.2002)

Schulbildung: 1980 - 1981 Grundschule Berg-Mark-Strasse, Wuppertal
1981 - 1984 Grundschule Peterstrasse, Wuppertal
1984 - 1990 Realschule Hohenstein, Wuppertal
1990 - 1993 Gymnasium Siegesstrasse, Wuppertal
Abitur: 05.1993

Studium: 10.93 - 02.98 Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
02.98 - 05.99 Diplomarbeit bei Prof. Dr. W. Rüger,
Lehrstuhl für Mikrobiologie,
Arbeitsgruppe „molekulare Genetik“
Thema : "Überexpression und Reinigung der ADP-
Ribosyltransferase ModB“

01.02.2000 Beginn der Promotion als wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Institut für Humangenetik der Universität GH Essen
bei Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Ehrenwörtliche Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Identifizierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors TRPS1" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Frank Kaiser befürworte.

Essen, den 08.07.2003

(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 08.07.2003

(Frank Kaiser)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 08.07.2003

(Frank Kaiser)